

Aus dem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

**DAS VERHALTEN CHEMOTHERAPEUTISCH
ANGEWANDTER DERIVATE DER 6-AMINOPENICILLANSÄURE
UND VON DANSYLPENICILLIN GEGENÜBER
PENICILLINASE**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Reiner Münch
aus Markt Schwaben

1974

1975

Aus dem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

**DAS VERHALTEN CHEMOTHERAPEUTISCH
ANGEWANDTER DERIVATE DER 6-AMINOPENICILLANSÄURE
UND VON DANSYLPENICILLIN GEGENÜBER
PENICILLINASE**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Reiner Münch

aus Markt Schwaben

1974

Referent: Professor Dr. Friedrich Körber

Korreferent: Professor Dr. R. Baethke



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 1. 1975

	Seite
A) <u>Allgemeiner Teil</u>	
I. Einführung	7
II. Klinische Anwendung von Penicillin und Penicillinase	11
III. Analytische Bestimmungsmethoden von Penicillin und Penicillinase	13
IV. Aufgabenstellung	14
B) <u>Ergebnisse</u>	
I. Analytik der Penicilline	
1. Photometrische Gehaltsbestimmung der untersuchten Penicilline und deren Klassifizierung auf Grund ihrer Bestimmbarkeit	16
2. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten der aus den untersuchten Penicillinen gebildeten Mercaptide - Gültigkeitsbereich des Lambert - Beerschen Gesetzes	18
II. Charakterisierung der Penicillinase	
Bestimmung der Michaeliskonstanten von Penicillinen	22
III. Differenzierung der untersuchten Penicilline in die Gruppen penicillinase - empfindlich, penicillinase - resistent und penicillinase - fest auf Grund ihrer Hydrolysegeschwindigkeit	27
IV. Hemmwirkung verschiedener Penicilline auf Penicillinase; Hemmungstypen	
1. Substratüberschußhemmung	29
2. Kompetitive Hemmung	33
3. Nichtkompetitive Hemmung	35
V. Darstellung, Charakterisierung und antibakterielle Wirksamkeit von Dansylpenicillin	
1. Darstellung	39

	Seite
2. Charakterisierung	
a) Dünnschichtchromatographie	39
b) UV Spektren	41
c) Fluoreszenzspektren	43
d) Infrarotspektrum	44
3. Antibakterielle Wirksamkeit	47
C) <u>Diskussion</u>	
I. Analytik der Penicilline	
1. Photometrische Gehaltsbestimmung der untersuchten Penicilline und Klassifizierung auf Grund ihrer Bestimmbarkeit	49
2. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten der gebildeten Mercaptide	50
II. Charakterisierung der Penicillinase	52
III. Differenzierung der Penicilline anhand ihrer Hydrolysegeschwindigkeit	55
IV. Hemmwirkung verschiedener Penicilline aus Penicillinase	56
Bedeutung der Hemmungstypen für die Kombination verschiedener Penicilline in der therapeutischen Anwendung	67
V. Darstellung, Charakterisierung und antibakterielle Wirksamkeit von Dansylpenicillin	68
D) <u>Zusammenfassung</u>	71

E) Material und Methoden

I.	Material	
1.	Geräte	73
2.	Präparate	74
3.	Reagenzien	74
4.	Lösungen	75
II.	Methoden	
1.	Gehaltsbestimmung von Penicillinen	
a)	nach enzymatischer Hydrolyse	76
b)	nach alkalischer Hydrolyse	77
2.	Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten	77
3.	Photometrische Bestimmung der kinetischen Parameter von Penicillinase Riker für verschiedene Substrate	
a)	photometrische Bestimmung der Penicillinaseaktivität	78
b)	photometrische Bestimmung der Hemmung der Penicillinase	79
4.	Darstellung von Dansylpenicillin	79
5.	Absorptionsspektren zwischen 210 nm und 360 nm bei verschiedenen pH Werten	81
6.	Fluoreszenzspektren von Dansylpenicillin bei $\text{excit} = 362,5 \text{ nm}$ zwischen 300 nm und 700 nm	81
7.	Infrarotspektrum von Dansylpenicillin	81
8.	Antibakterielle Prüfung von Dansylpenicillin	82
9.	Systematik der verwendeten Penicilline	83
10.	Mathematischer Anhang	85
11.	Aufstellung der verwendeten Symbole	89

F) Literaturverzeichnis

91

G) Danksagungen

101

H) Lebenslauf

102

A) Allgemeiner Teil

I. Einführung

Die Zahl der bis heute entwickelten und entdeckten Antibiotika reicht in die Hunderte, und über 40 sind so weit entwickelt worden, daß sie in der Therapie von Infektionskrankheiten eine Bedeutung erlangt haben (1). Von all diesen Antibiotika haben sich Penicillin G und andere Derivate der 6-Aminopenicillansäure in der medizinischen Praxis am meisten bewährt (2). Hieraus erklärt sich die Tatsache, daß Penicilline seit 1940 ein Schwerpunkt der biochemischen, antimikrobiellen und pharmakologischen Forschung sind.

Eine der Hauptbemühungen diente der Aufklärung der Wechselwirkung zwischen Bakterienzelle und Penicillinmolekül.

Die in der Literatur mitgeteilten Beobachtungen weisen auf einen einheitlichen Mechanismus der Wirkung von Penicillinen auf die Bakterienzelle hin:

1. Verschiedene Arten von Bakterien zeigen nach Einwirkung von Penicillin das gleiche mikroskopische Bild, eine Vergrößerung des Bakterienleibs, der schließlich platzt und ausläuft - Bakteriolyse - (3, 4).
2. Bei der Einwirkung von Penicillin auf Bakterien wurden sog. Park-Nucleotide nachgewiesen (5), das sind niedrigmolekulare Bestandteile der Zellmembran, die als Derivate von Uridin-5'- diphosphat identifiziert und ursprünglich als Bestandteil der Nucleinsäure der Bakterienzelle interpretiert wurden (6).
3. Verschiedene Arten von stäbchenförmigen Bakterienzellen quellen in Gegenwart von Penicillin im hypertonischen Medium zu sphärischen Zellen, den sog. Sphäroplasten (7). Diese Bakterienform ähnelt der bei der Behandlung von Zellen mit Lysozym im hypertonischen Medium entstehenden Bakterienform, die hier Protoplasten genannt wurden. Als Sphäroplasten werden heute im allgemeinen

die Gebilde bezeichnet, die einen Teil der Zellwand behalten, während Protoplasten Gebilde ohne Zellwand sind.

4. Untersuchungen von Maass (8) und Eagle (9) mit radioaktiv markiertem Penicillin ermöglichten eine quantitative Aussage über die von den Zellen aufgenommene Anzahl an Penicillinmolekülen. Eagle konnte eine Korrelation zwischen der aufgenommenen Menge an Penicillin und dem Einfluß auf Wachstum und Vermehrung der Bakterienkultur aufstellen (9) sowie eine Abhängigkeit zwischen Konzentration des Penicillins im Außenmedium und Konzentration des Penicillins in der Bakterienzelle feststellen (10).
5. Cooper (11) beschrieb die sog. "Penicillin-Binding Component", ein Fragment der Staphylokokkenzelle, das sich durch einen Lipidanteil auszeichnet. Diese penicillinbindende Komponente konnte später als ein Anteil der Zytoplasmamembran identifiziert werden.
6. Mitchel et al. (12) konnten ferner zeigen, daß Zellen, die sich im Ruhestand befinden, weit weniger empfindlich sind als Zellen in der Wachstumsphase. Aufgrund dieser Beobachtungen und anderer Befunde (13) konnte angenommen werden, daß der Angriffspunkt der Penicillinwirkung an der Zellmembran zu finden ist. Bei der Synthese der Zellwand werden zwei Reaktionsschritte durchlaufen, die penicillinempfindlich sind. Dabei handelt es sich um die Hemmung der für diese Schritte notwendigen Enzyme:

1. Glykopeptid-Transpeptidase,
2. Carboxypeptidase.

Für die Hemmung beider Enzyme ist ein intakter β -Lactamring notwendig. Cephalosporine sind ebenfalls wirksam, da auch hier die β -Lactamstruktur vorhanden ist.

Die Empfindlichkeit gegenüber Penicillin ist jedoch nicht bei allen Bakterienarten in gleichem Maße vorhanden. Es werden verschiedene Arten der Resistenz unterschieden:

1. eine sog. "intrinsic resistance" (konstitutive Resistenz);
2. eine aktive Resistenz, die auf der Fähigkeit beruht, eine β -Lactamase zu synthetisieren.

Bei der konstitutiven Resistenz unterscheidet man:

1. die Bildung von "persisters"

Dieser von Bigger (14, 15) geprägte Begriff beschreibt das Verhalten einzelner Bakterien einer genetisch einheitlichen Kultur, die im Zustand der Bakteriostase verharren und so der Wirkung der β -Lactam-Antibiotika nicht zugänglich sind.

2. Bildung von L-Phasen-Zellen

Klieneberger und Nobel konnten beobachten, daß unter Penicillineinwirkung in serumhaltigen Nährböden Staphylokokken sog. L-Phasen-Zellen bilden können, die gegenüber Penicillin unempfindlich sind (16).

Hierzu gehören auch die durch Permeabilitätsbeschränkung des Penicillins durch die Bakterienwand, sowie die durch die osmotischen Verhältnisse im Inneren der Bakterien, die für den Vorgang der Lyse des Bakterienleibs verantwortlich sind, bedingten Formen der Resistenz.

Unterschiede in der Permeabilität der Bakterienwände für Penicillin bewirken auch z. T. die unterschiedliche Penicillinwirkung auf Grampositive und Gramnegative Bakterien (17, 18). Gram-negative Bakterien haben einen größeren Anteil an Lipiden in ihrer Wandschicht, die ein Diffusionshindernis für Penicillin sein dürften.

Bereits 1940 wurde von Abraham und Chain (19) die Beobachtung gemacht, daß ein Enzym existieren muß, das die Fähigkeit hat, Penicillin zu inaktivieren. Dieses Enzym, die Penicillinase, wird von vielen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gebildet. Nach dem Ort, an dem das Enzym verbleibt, wird es als Endoenzym bezeichnet, wenn es intrazellulär auftritt, oder als Exoenzym bezeichnet, wenn es an das umgebende Medium abgegeben wird.

Verschiedene Autoren (20, 21) fanden, daß bei der Reaktion der Penicillinase mit Penicillin eine neue Säuregruppe entsteht. Das Hydrolyseprodukt

wurde als Penicillosäure bezeichnet (20, 21, 22). Die Penicillinase ist eine Penicillin-amido-Lactamhydrolase (E.C. 3. 5. 2. 6), die die Hydrolyse der Amidbindung des β -Lactamrings im Penicillinmolekül katalysiert:

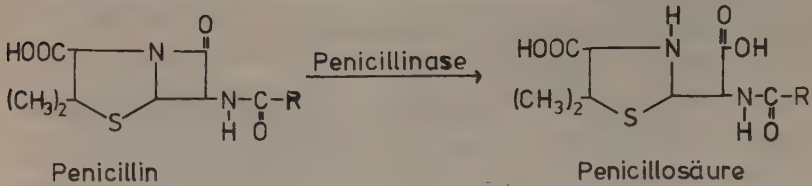


Abbildung 1

Penicillinase-Reaktion

Einige Bakterienstämme bilden Penicillinase primär, während sie bei anderen erst nach Einwirkung von Penicillinen nachweisbar ist. Im ersten Fall handelt es sich um eine konstitutive Enzymsynthese, im zweiten Fall um eine induktive Enzymsynthese. Bondi et al (23) erkannten schon früh, daß die Wirkung von Penicillinase die häufigste Ursache der Penicillinresistenz ist. Die durch Penicillin bei verschiedenen Stämmen bedingte Induktion von Penicillinase steht heute der Therapie mit Penicillinen häufig entgegen. Das Bestreben geht dahin, die durch die Penicillinase bedingte Resistenz zu überwinden, wobei sich neben anderen Möglichkeiten hauptsächlich anbieten:

1. Penicilline, die keine Penicillinase induzierende Wirkung haben, zu synthetisieren, wobei man mit Quinacillin [6 - (3-carboxy-2-quinolalinylamido) Penicillansäure] eine Substanz entwickelt hat, die diese Voraussetzung weitgehend erfüllt.
2. Penicilline, die von β -Lactamasen nicht hydrolysiert werden, zu synthetisieren.

Die Entdeckung, daß 6-Aminopenicillansäure durch Fermentation (24) oder durch enzymatische Hydrolyse von Benzylpenicillin erhalten werden kann (25, 26, 27), ermöglichte die Herstellung einer Reihe halbsynthetischer Penicilline, von denen sich besonders die chlorierten Isoxazolylpenicilline als hochgradig penicillinaseresistent erwiesen. Dieser Vorteil der Resistenz gegen das Enzym wird allerdings dadurch gemindert, daß

halbsynthetische Penicilline die Synthese des Enzyms in stärkerem Maße als natürliche Penicilline induzieren.

II. Klinische Anwendung von Penicillin und Penicillinase

Penicillin wird heute bei einer Vielzahl von durch die unterschiedlichsten Erreger hervorgerufenen Infekten wegen seiner sehr geringen Toxizität als das Mittel der Wahl angewandt. Durch die Entwicklung der halbsynthetischen penicillinase-resistenten Penicilline konnte das Spektrum der beeinflussbaren Erreger immer weiter ausgedehnt werden.

Eine Erweiterung des antibakteriellen Spektrums wird weiterhin dadurch erreicht, daß man eine Kombination eines Breitbandantibiotikums, z. B. Ampicillin, und eines penicillinase-resistenten Penicillins, z. B. Cloxacillin, zur Therapie einsetzt. Bei dieser Kombination wird davon ausgegangen, daß einmal die penicillinase-festen Penicilline eine Hemmung der Penicillinase bewirken und damit die Aktivität des Enzyms für das nicht-resistente Substrat herabsetzen, zum anderen, daß das resistente Substrat selbst seine Wirkung als Penicillin entfaltet.

Mit der verstärkten Anwendung der Penicilline in der Therapie traten aber auch immer häufiger allergische Reaktionen auf. Diese manifestieren sich in verschiedenen immunologischen Mustern (28). Bei der Diskussion des immunologischen Aspekts der allergischen Reaktionen geht man davon aus, daß das Hauptantigen einmal aus Benzylpenicillin direkt durch Konjugation mit Lysinresten von Proteinen entsteht (29), zum anderen, daß aus dem Abbauprodukt Benzylpenicillensäure Penicilloxylderivate gebildet werden (30, 31, 32).

Allerdings gibt es auch Penicillinallergien, bei denen sog. "minor" Antigen-determinanten im Gegensatz zu den oben genannten "major" Antigen-determinanten die allergische Reaktion induzieren. Als Hapten dieser Penicillinallergie fungieren die Abbauprodukte von Benzylpenicillin (33). Die Prophylaxe von Penicillinallergien ist von großer Bedeutung.

In den USA weisen bereits 5 - 10 % der Gesamtbevölkerung allergische Reaktionen nach Gabe von Penicillinen auf; etwa 80 % der Medikamenten-Allergien sind auf Penicillin zurückzuführen (34). Etwa 11 % der in den USA erzeugten Milch enthält meßbare Mengen von Penicillin (35). Penicillosäure verbindet sich nicht mit Protein; sie wirkt nicht antigen und spielt bei der Penicillinallergie keine Rolle (36). Möglicherweise wirkt die Penicillosäure sogar als monovalenter Inhibitor für die Antikörper, die sich gegen das antigen-wirkende Penicilloyl-substituierte Protein richten (37). Hierauf begründet sich die Überlegung, Penicillinase zur Therapie der allergischen Penicillinreaktionen einzusetzen.

Becker (38) untersuchte die Wirkung einer parenteralen Injektion von Penicillinase auf das zirkulierende Penicillin im Tierversuch und fand, daß bereits nach einmaliger Injektion kein im Blut zirkulierendes Penicillin mehr nachgewiesen werden konnte. Klinische Untersuchungen (35, 39, 40) ergaben gute Ergebnisse bei Penicillin-Allergie bedingten Erscheinungsbildern von Urticaria, Pruritus und Serumkrankheit.

Zur Behandlung von anaphylaktischen Reaktionen, die durch Penicillin hervorgerufen werden, empfiehlt sich ebenfalls die Therapie mit Penicillinase; allerdings sollte zuerst eine "Schocktherapie" eingeleitet werden (41).

Es wurde auch diskutiert, Penicillinase nach Beendigung einer Penicillintherapie bereits prophylaktisch zu verabreichen, um das Penicillin möglichst rasch aus der Blutbahn zu entfernen und so die Bildung von Antikörpern zu unterdrücken (34). Hierbei ist allerdings zu bedenken, daß Penicillinase selbst ein Protein ist, das Antikörperbildung induzieren kann. Es sollte daher nur bei strenger Indikation verabreicht werden.

Protivinski wies darauf hin, daß die halbsynthetischen Penicilline von Penicillinase Riker nicht so rasch abgebaut werden wie Penicillin G. Er konnte bei den von ihm untersuchten Penicillinen eine maximale Enzymwirkung nach 2 Stunden feststellen (34).

III. Analytische Bestimmungsmethoden von Penicillin und Penicillinase

Die analytischen Bestimmungsmethoden für die Penicillinase beruhen auf denen für Penicillin (42). Drei Prinzipien der Penicillinasebestimmung sind bekannt:

1. Mikrobiologische Bestimmung (vergl. 43)

Nicht hydrolysiertes Penicillin wird nach Abtrennung des Enzyms mikrobiologisch bestimmt (44, 45, 46, 47). Andere Autoren inkubieren Penicillin mit Enzym unterschiedlicher Konzentration und bestimmen die Enzymmenge dadurch, daß sie die Penicillinmenge bestimmen, die ein eben noch sichtbares Wachstum ermöglicht (48, 49, 50, 51).

Die hier skizzierten biologischen Bestimmungsmethoden haben den Vorteil, daß sie eine spezifische Bestimmung einmal des Substrats (Penicillin) und des Enzyms (Penicillinase) ermöglichen; sie haben aber den Nachteil, daß das Ergebnis erst nach Bakterienwachstum, also erst nach 24 - 48 Stunden abgelesen werden kann.

2. Chemische Bestimmung

a) manometrische Methode

Die von Henry und Housewright (52) angegebene manometrische Bestimmungsmethode beruht auf dem Prinzip, daß bei der Spaltung von Penicillin durch Penicillinase in Gegenwart von Hydrogencarbonat CO_2 freigesetzt wird.

b) alkalimetrische Methode

Die von verschiedenen Autoren (53, 54) angegebenen alkalimetrischen Bestimmungsmethoden, bei denen die durch die Spaltungsreaktion entstehende Säuregruppe titriert wird, haben wie die manometrische Methode zwar den Vorteil der relativ kurzen Bestimmungszeit, allerdings den Nachteil der nicht ausreichenden Empfindlichkeit. Die geringsten Substratkonzentrationen, die zur Penicillinbestimmung eingesetzt werden konnten, lagen für die manometrische Methode bei $80 \mu\text{Mol/l}$ und bei der alkalimetrischen bei $70 \mu\text{Mol/l}$ (55).

c) jodometrische Methode

Die von Perret (56) beschriebene und von Citry (57) modifizierte Methode basiert auf der Reduktion von Jod durch Penicillosäure. Diese Reaktion verläuft allerdings nicht streng stöchiometrisch (58). Je nach Bedingungen reagieren 8 - 9 Atome Jod mit einem Molekül Benzylpenicillosäure. Zwar läßt sich dieses Verfahren im Gegensatz zu den vorherigen auch über weite pH-Bereiche anwenden, doch treten hier zusätzliche Fehlerquellen auf. Einmal können reduzierende Verunreinigungen des Penicillins zu falschen Ergebnissen führen, zum anderen beschrieb Citry (57), daß die verschiedenen Penicillinasen, die zur Spaltung des Penicillins eingesetzt wurden, einer unterschiedlichen Hemmung durch Jod unterliegen.

Die Einführung der jodometrischen Mikromethode von Novick (59), bei der die Entfärbung des Jod-Stärke-Komplexes photometrisch verfolgt werden kann, erlaubt auch eine Enzymaktivitätsmessung bei kleinen Substratkonzentrationen (bis zu $1 \mu \text{ Mol/l}$); allerdings bestehen auffällige Diskrepanzen in den Ergebnissen im Vergleich zu anderen Methoden.

3. Enzymatisch-photometrische Bestimmung

Rossmann (60) beschrieb eine Methode, bei der durch die enzymatische Spaltung von Benzylpenicillin in Benzylpenicillosäure und der Reaktion der Penicillosäure mit p-Chlormercuribenzoat (pCMB) ein Mercaptid auftritt, das eine Zunahme der Extinktion bei 250 nm bewirkt, die photometrisch verfolgt werden kann.

IV. Aufgabenstellung

Die bisherige Anwendung unterschiedlicher analytischer Bestimmungsverfahren für Penicillin und Penicillinase ließ es sinnvoll erscheinen, das Verhalten chemotherapeutisch angewandter Derivate der 6-Aminopenicillansäure und von Dansylpenicillin gegenüber Penicillinase Riker mit einer spezifischen auf diese Fragestellung anwendbaren Methode zu untersuchen, um einwandfrei vergleichbare Ergebnisse am Beispiel eines klinisch angewandten Enzympräparats zu erhalten.

Es wurde untersucht, welche Penicilline mit der enzymatisch-photometrischen Methode bestimmt werden können.

Es wurden kinetische Parameter bestimmt, wobei unter Beibehaltung des Enzyms (Penicillinase Riker) die enzymatisch-analytisch bestimmbaren Penicilline als Substrat eingesetzt wurden. Aufgrund der Ergebnisse sollte der therapeutische Nutzen von Penicillinase Riker diskutiert werden. Ferner sollte die Hemmung des Enzyms durch schwer spaltbare Penicilline untersucht werden. Aus den Ergebnissen sollte eine Aussage über die Effektivität der Therapie mit Penicillinase, bzw. den Wirkungsmechanismus von Kombinationspräparaten hinsichtlich ihrer Hydrolyse durch Penicillinase gemacht werden.

Die Synthese von Dansylpenicillin sollte Aufschluß darüber geben, ob die Sulfonamidgruppe im Penicillinmolekül eine Änderung im kinetischen Verhalten der Penicillinase Riker bewirkt.

B) Ergebnisse

I. Analytik der Penicilline

1. Photometrische Gehaltsbestimmung nach Siegmund et al (61)

Prinzip der Methode:

Eine definierte Penicillinmenge wird in eine pCMB-Lösung pipetiert, deren genaue Molarität vorher durch Titration mit Cystein bestimmt wurde. Nach Zugabe von Penicillinase wird das Ende der enzymatischen Hydrolyse (Konstanz der Extinktion) abgewartet und anschließend nicht umgesetztes pCMB mit Cystein zurücktitriert.

Die Penicilline, bei denen in diesem Zeitraum keine wesentliche Hydrolyse des β -Lactamrings beobachtet werden konnte, wurden nach alkalischer Hydrolyse zur Gehaltsbestimmung eingesetzt. Da einige Penicilline stark hygroskopisch sind, wurden alle Präparate im Exsikkator über P_2O_5 trocken aufbewahrt. Die Luftfeuchtigkeit im Wägegehäuse wurde durch regelmäßiges Erneuern von Silicagel niedrig gehalten. In der geläufigen, im folgenden begründeten Einteilung der Penicilline sind die Ergebnisse in drei Gruppen zusammengefaßt:

Penicillinase-empfindliche Penicilline hydrolysieren nach Zugabe des Enzyms innerhalb von 3 Minuten vollständig und können mit der enzymatischen Methode quantitativ bestimmt werden (Tabelle 1a).

Penicillinase-resistente Penicilline, 6-Aminopenicillansäure und das nach eigener Vorschrift synthetisierte Dansylpenicillin lassen sich ebenfalls mit hinreichender Genauigkeit bestimmen, jedoch erfordert die enzymatische Hydrolyse eine längere Wartezeit (Tabelle 1b).

Penicillinase-feste Penicilline, zu denen die halogenierten Oxacilline gehören, lassen sich nur nach chemischer Hydrolyse im alkalischen Milieu quantitativ bestimmen (Tabelle 2), da die enzymatische Hydrolyse sehr langsam verläuft (Tabelle 1c). Zu dieser Gruppe sollte hinsichtlich der Analytik auch die Grundsubstanz, das Oxacillin gezählt werden, da die enzymatische Hydrolyse unbefriedigende Ergebnisse lieferte.

Tabelle 1

Gehaltsbestimmung von Penicillinen mit pCMB nach enzymatischer Hydrolyse. Angegeben sind die erforderlichen Hydrolysezeiten und die nachgewiesenen Substanzmengen in % der aus der Einwaage berechneten Mengen für

- a) penicillinase-empfindliche Penicilline,
- b) penicillinase-resistente Penicilline,
- c) penicillinase-feste Penicilline.

	Eingesetztes Substrat	Reaktionszeit (min)	Gehalt (%)
a)	Penicillin G Na	3	97.0
	Penicillin V K	3	97.6
	Pheneticillin	3	81.7
	Propicillin	3	93.0
	Ampicillin	3	91.6
	Ampicillin Na	3	92.0
	Carbenicillin	3	89.3
b)	Dansylpenicillin	15	91.2
	Nafcillin	15	101.3
	6-Aminopenicillansäure	15	95.2
	Oxacillin	15	72.0
c)	Oxacillin	15	72.0
	Cloxacillin	5	13.6
		180	76.2
	Dicloxacillin	5	7.6
		180	43.9
	Flucloxacillin	180	22.9

Tabelle 2

Gehaltsbestimmung von Penicillinen mit pCMB nach chemischer (alkalischer) Hydrolyse. Angegeben sind die erforderlichen Hydrolysezeiten und die nachgewiesenen Substanzmengen in % der aus der Einwaage berechneten Mengen für die penicillinase-festen Penicilline.

Eingesetztes Substrat	Reaktionszeit (min)	Gehalt (%)
Oxacillin	180	96.8
Cloxacillin	180	95.1
Dicloxacillin	180	96.7
Flucloxacillin	180	94.9

2) Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{250 \text{ nm}}$) der gebildeten Mercaptide

Prinzip der Methode:

Zu einer pCMB-Lösung werden verschiedene Konzentrationen von Penicillin gegeben. Nach Zugabe von Enzym wird das Ende der Hydrolyseaktion abgewartet und die abgelesene Extinktion in Abhängigkeit von der aus der Einwaage berechneten Konzentration an Penicillosäure aufgetragen. Der Bereich, in dem die gemessenen Werte auf einer Geraden liegen, wird in der folgenden Tabelle als Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes angegeben. Die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten erfolgt nach der Gleichung

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

als Steigung der Geraden dividiert durch die Schichtdicke ($d = 4 \text{ cm}$).

Für die untersuchten Substanzen gilt das Lambert-Beersche Gesetz in jedem Falle bis zu Extinktionsänderungen von 0,5 bzw. der Bildung von ca. $0,01 \mu\text{Mol}$ Penicilloat pro ml Ansatz.

Tabelle 3

Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes und Extinktionskoeffizienten für Penicillinase-empfindliche Substrate und 6-Aminopenicillansäure.

Die Richtigkeit des Gültigkeitsbereichs ist durch die Angabe der Korrelationskoeffizienten belegt.

Substrat	Gültigkeitsbereich		Korrelationskoeffizient r	Extinktionskoeffizient (cm ² /Mol)
	Ext. bis	Konz. im Ansatz bis		
Penicillin G Na ⁺⁾	0,5	15 µmol/l	0,999	8,95 · 10 ⁶
Penicillin V K	0,5	12 µmol/l	0,999	9,83 · 10 ⁶
Pheneticillin	0,5	14 µmol/l	0,999	8,55 · 10 ⁶
Propicillin	0,5	12,5 µmol/l	0,999	10,17 · 10 ⁶
Carbenicillin	0,5	12 µmol/l	1,000	8,57 · 10 ⁶
Ampicillin	0,6	15 µmol/l	0,999	9,90 · 10 ⁶
6-Aminopenicillansäure	0,5	15 µmol/l	0,999	8,03 · 10 ⁶

+) Werte aus Dissertation Rossmann (62)

Zur Beantwortung der Frage, ob die Penicillosäure auch ohne Gegenwart von pCMB eine Extinktion bei 250 nm aufweisen, wurden Kontrollbestimmungen durchgeführt, bei denen die pCMB-Lösung durch Phosphatpuffer (pH = 6,8, I = 0,2) ersetzt wurde.

Bei zwei Substraten (Dansylpenicillin und Nafcillin) war die konzentrationsabhängige Eigen-Extinktion im Phosphatpuffer so groß, daß eine Korrektur des Extinktionskoeffizienten vorgenommen werden mußte.

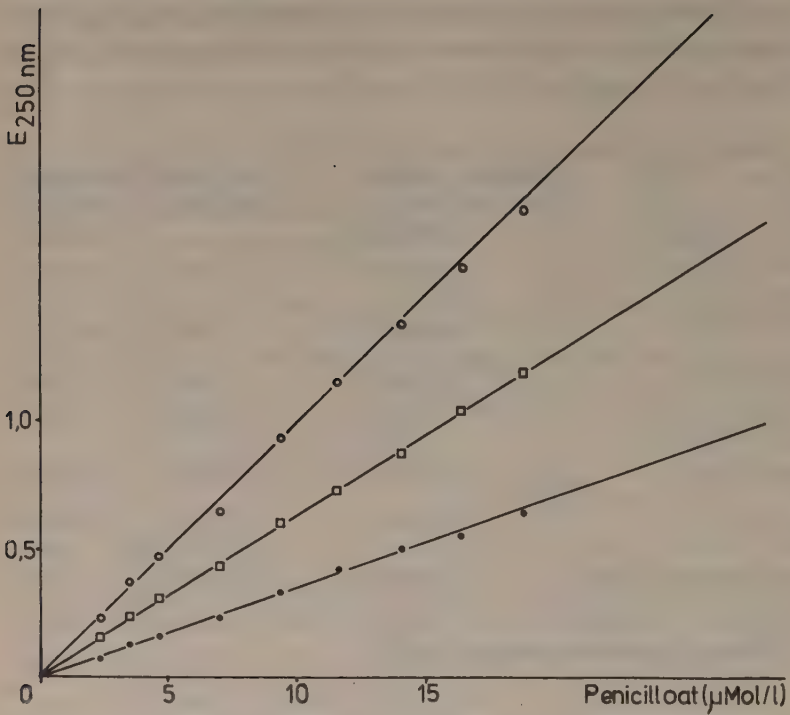


Abbildung 2

Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes für das aus Dansylpenicillo-
säure gebildete Mercaptid

- a) $\circ - \circ$ Dansylpenicillin + Penicillinase mit pCMB
- b) $\square - \square$ Dansylpenicillin + Penicillinase ohne pCMB
- c) $\bullet - \bullet$ Differenzkurve (a-b)

Aus der Differenzkurve wurde der Extinktionskoeffizient berechnet. Bei Penicillinen ohne Eigenabsorption bei 250 nm erhält man nur die c) entsprechende Kurve, aus der ϵ direkt berechnet werden kann.

Tabelle 4

Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes und Extinktionskoeffizienten für Substrate, die einen Naphthalinring enthalten (Vergl. Abbildung 2). Der Extinktionskoeffizient für das gebildete Mercaptid wurde hier aus der Differenz der Steigungen der Regressionsgeraden (Bestimmung mit und ohne pCMB Zusatz) berechnet. Die Richtigkeit des Gültigkeitsbereiches ist durch die Angabe der Korrelationskoeffizienten belegt. r_a bedeutet Korrelationskoeffizient der Messungen in pCMB - Lösung (Abb. 2, Kurve a), r_b bedeutet Korrelationskoeffizient der Messungen in Puffer (Abb. 2, Kurve b).

Substrat	Gültigkeitsbereich		Korrelationskoeffizienten		Extinktionskoeffizient (cm^2/Mol)
	Ext. bis	Konz. im Ansatz bis	r_a	r_b	
Dansyl-Penicillin	1, 8	18, 8 $\mu\text{mol/l}$	0, 997	0, 997	$8, 43 \cdot 10^6$
Nafcillin	0, 57	11 $\mu\text{mol/l}$	0, 999	1, 000	$9, 15 \cdot 10^6$

II. Charakterisierung der Penicillinase

Aktivitätsbestimmung der Penicillinase Riker bei verschiedenen Substratkonzentrationen zur Bestimmung von Michaeliskonstanten.

Prinzip der Methode:

Die Penicillinaseaktivität wird bei verschiedenen Substratkonzentrationen zwischen 20 und 200 $\mu\text{Mol/l}$ bestimmt. Als Substrate werden alle mit der enzymatisch-photometrischen Methode nachweisbaren Penicilline (aufgeführt in Tab. 2a) und 2b)) eingesetzt. Die Extinktion wird im Abstand von 15 s nach Start mit Enzym bestimmt und eine Gerade durch die Meßpunkte der ersten Minuten gelegt (Abb. 3). Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten kann aus der Steigung der Geraden die Aktivität des Enzyms in $\mu\text{mol/min}$ umgesetztes Substrat berechnet werden.

Penicillinasebestimmungen sind sowohl für biochemische als auch klinische Fragestellung von Bedeutung. Untersucht wurde deshalb die Aktivität von Penicillinase Riker gegenüber den in der Übersicht angegebenen Penicillinen und deren Michaeliskonstanten bestimmt. Die ermittelten kinetischen Parameter zeigen, daß Pen.G das geeignetste Substrat ist und bestätigten die Einteilung der Substrate in die genannten Gruppen penicillinase-empfindlich und penicillinase-resistent (Tab. 1a und 1b).

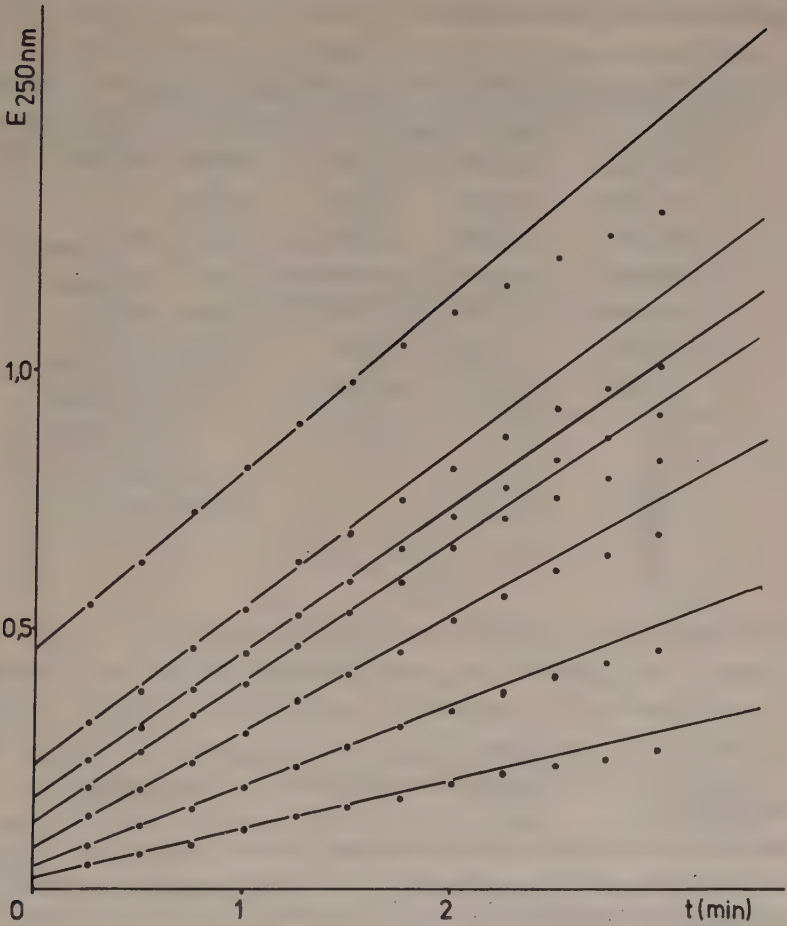


Abbildung 3

Beispiel zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeiten für die graphische Extrapolation von K_m . Gemessen wurde der Substratumsatz bei verschiedenen Konzentrationen von Penicillin V K.

Tabelle 5

Zahlenwerte zur Konstruktion des Lineweaver-Burk-Diagramms (63)
für Penicillin V K (Vergl. Abb. 3).

[S] (μmol/l)	Δ E/min	min/Δ E	$\frac{1}{[S]}$ (l/Mol)
243,4759	0,3480	2,8735	$4,1071 \cdot 10^3$
121,7879	0,3046	2,2829	$8,2109 \cdot 10^3$
97,39	0,2823	3,5423	$10,2679 \cdot 10^3$
73,0425	0,2710	3,6900	$13,6906 \cdot 10^3$
48,6950	0,2233	4,4782	$20,5359 \cdot 10^3$
24,3475	0,1556	6,4267	$41,0719 \cdot 10^3$
12,1732	0,0933	10,7181	$82,1476 \cdot 10^3$

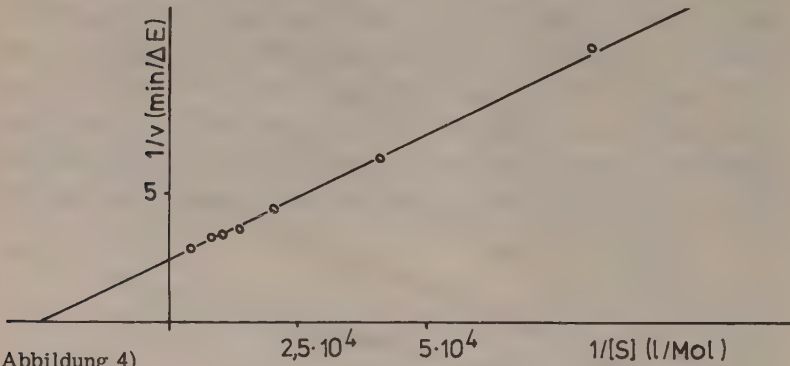


Abbildung 4)

Lineweaver-Burk-Diagramm für Penicillin V-Kalium (Abb. 3, Tab. 5)

Die Michaeliskonstante wurde als $K_m = 41,6 \mu\text{Mol/l}$ graphisch ermittelt.

Berechnete Reaktionsgerade $\frac{1}{v} = 0,1005 \frac{1}{s} + 2,400$

Korrelationskoeffizient $r = 0,9996$

Die entsprechend ermittelten Michaeliskonstanten sind in den Tabellen
6 und 7 aufgeführt.

Tabelle 6

Michaeliskonstanten für penicillinase-empfindliche Penicilline und 6-Aminopenicillansäure. Die Substratkonzentrationen wurden von 20 $\mu\text{Mol/l}$ bis 200 $\mu\text{Mol/l}$ variiert. Angegeben sind die jeweils eingesetzten Enzymverdünnungen, die eine einwandfreie Messung der Umsatzgeschwindigkeiten ermöglichten, sowie die Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Lineweaver-Burk-Geraden.

Substrat	verwendete Enzymverdünnung	Korrelationskoeffizient r	K_m ($\mu\text{Mol/l}$)
Penicillin G Na	1 : 200	0,997	40,3
Penicillin VK	1 : 200	0,999	41,6
Pheneticillin	1 : 200	0,999	143,0
Carbenicillin	1 : 40	0,998	88,5
6-Aminopenicillansäure	-	0,999	217,4

Bei Ampicillin und Propicillin war die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten innerhalb der Substratkonzentrationen von 20-200 $\mu\text{Mol/l}$ nicht möglich, da bereits vor Zugabe der Penicillinase eine hohe Spontanhydrolyse auftrat, die eine korrekte Messung nicht gestattete. Durch eine Verringerung der eingesetzten Substratkonzentrationen wurde die Spontanhydrolyse so klein gehalten, daß die Michaeliskonstante ermittelt werden konnte.

Bei Nafcillin war eine Bestimmung der Michaeliskonstanten mit Substratkonzentrationen von 20 - 200 $\mu\text{Mol/l}$ nicht möglich, da die hohen Anfangs-extinktionen bei höheren Konzentrationen eine Messung der Umsatzgeschwindigkeit nicht mehr zuließen.

Gleiches gilt für Dansylpenicillin. Außerdem findet sich hier mit zunehmender Konzentration des Substrats eine Verminderung der Umsatzgeschwindigkeit.

Tabelle 7

Michaeliskonstanten für die Penicilline, bei denen zur Bestimmung von K_m die Messungen bei geringeren Substratkonzentrationen als 20 - 200 $\mu\text{Mol/l}$ durchgeführt werden mußten. Angegeben sind die jeweils eingesetzten Enzymverdünnungen, die eine einwandfreie Messung der Umsatzgeschwindigkeit ermöglichten, sowie die Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Lineweaver-Burk-Geraden.

Substrat	verwendete Enzymverdünnung	Korrelationskoeffizient r	K_m ($\mu\text{Mol/l}$)
Ampicillin	1 : 20	0,999	87,7
Propicillin	1 : 20	0,997	41,2
Dansylpenicillin	1 : 5	0,999	29,8
Nafcillin	1 : 3	0,991	11,2

III. Differenzierung der Penicilline in die Gruppen Penicillinase -
empfindlich, Penicillinase - resistent und Penicillinase - fest
auf Grund von $V_{\max}$

An Hand der Werte für die Michaeliskonstante, die eine Aussage über die Affinität der Penicillinase zu den einzelnen Substraten macht, kann eine Differenzierung in resistente, empfindliche und feste Substrate, wie sie für die Klinik und Mikrobiologie interessant ist, nicht vollzogen werden.

Um eine Aussage über die Empfindlichkeit der Substrate gegenüber Penicillinase Riker zu erhalten, wurden die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der verschiedenen Substrate auf eine Enzymkonzentration bezogen. Da die Penicillinase Riker in Form von 2 ml Ampullen zur therapeutischen Anwendung gelangt, empfiehlt es sich, die errechneten maximalen Aktivitäten für eine Ampulle Penicillinase Riker anzugeben, um Vergleiche der Effektivität des Enzyms anstellen zu können.

Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

Relative Aktivität der Penicillinase gegenüber verschiedenen Substraten. Aufgeführt sind die nach der enzymatisch-photometrischen Methode bestimmbaren Substrate, die zur Bestimmung der K_m -Werte eingesetzten Enzymverdünnungen, die aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm extrapolierten Werte für die maximale Umsatzgeschwindigkeit und die aus diesen Werten berechneten internationalen Einheiten (IU), die in einer Ampulle Penicillinase Riker für das entsprechende Substrat enthalten sind. In der letzten Spalte wird die relative Aktivität aufgeführt, wobei die Aktivität des Enzyms für Penicillin G Na. = 100 gesetzt wurde.

	Enzymverdünnung	$\frac{1}{V_{\max}}$ (min/ ΔE)	$V_{\max}$ (ΔE /min)	$V_{\max}$ ($\mu\text{Mol}/\text{min}$)	IU in 2ml Penicillinase-lösung	relative Aktivität in %
Penicillin G Na	1 : 200	1,1793	0,8479	23,6843 10^{-3}	473,686	100,0
Penicillin V K	1 : 200	2,400	0,4166	10,5951 10^{-3}	211,902	44,7
Ampicillin	1 : 50	1,6204	0,6171	15,5833 10^{-3}	77,916	16,4
Pheneticillin	1 : 200	3,7749	0,2649	7,7456 10^{-3}	154,912	32,7
Propicillin	1 : 50	1,3086	0,7641	18,7831 10^{-3}	93,915	19,8
Carbenicillin	1 : 40	1,8082	0,5530	16,1318 10^{-3}	64,527	13,6
Dansylpenicillin	1 : 5	1,5925	0,6279	18,6209 10^{-3}	9,310	2,0
Nafcillin	1 : 3	5,0866	0,1965	5,3688 10^{-3}	1,610	0,3
6-Aminopenicillansäure	unverdünn	1,4531	0,6881	21,4227 10^{-3}	2,142	0,4

IV. Hemmwirkung verschiedener Penicilline auf Penicillinase;

Hemmungstypen

1. Substratüberschußhemmung

Prinzip der Methode:

Zur Untersuchung der Frage der Substrathemmung wird nach dem gleichen Prinzip gearbeitet, das auch zur Bestimmung des K_m -Wertes angewandt wird, nur wird der Konzentrationsbereich des Substrates entsprechend erweitert, wobei die obere Grenze der eingesetzten Substratkonzentration bestimmt wird durch

1. die Größe der gemessenen Eigenextinktion des Substrats und
2. durch die abnehmende Substratumsatzgeschwindigkeit.

Aus den Werten, die auf einer Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm liegen, wird die Regressionsgerade zur Ermittlung von K_m bestimmt.

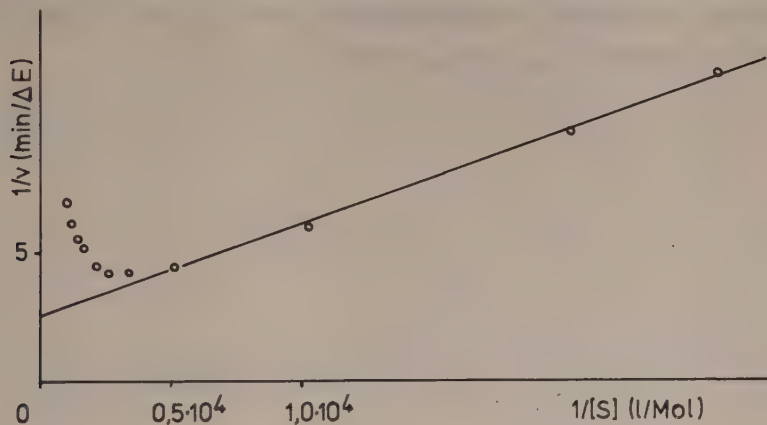


Abbildung 5

Lineweaver-Burk-Diagramm für Pheneticillin

Die Umsatzgeschwindigkeit nimmt bis $200 \mu\text{Mol/l}$ zu. Bei Konzentrationen über $200 \mu\text{Mol/l}$ setzt zunehmend Substrathemmung ein. K_m wurde zu $143 \mu\text{Mol/l}$ bestimmt (Tab. 6).

Substrathemmung wurde bei Konzentrationen $> 200 \mu\text{Mol/l}$ Bestimmungsansatz für Pheniticillin (Abb. 5), Penicillin V Kalium und Carbenicillin gefunden. Bei Dansylpenicillin tritt Substrathemmung bereits bei Konzentrationen $> 25 \mu\text{Mol/l}$ Bestimmungsansatz ein. Die hier angegebenen Werte sind der Abb. 5 analogen Diagrammen entnommen.

Um die festgestellte Substrathemmung weitergehend interpretieren zu können, werden die erhaltenen Werte für $\Delta E/\text{min}$ in einem Diagramm gegen den Logarithmus der Substratkonzentration aufgetragen (64).

Aus der so feststellbaren optimalen Geschwindigkeit v_{opt} und dem dazu gehörigen Wert für die optimale Substratkonzentration $[S]_{\text{opt}}$ läßt sich dann mit Hilfe der im mathematischen Anhang gemachten Überlegung der Wert für V_{max} und K_m finden.

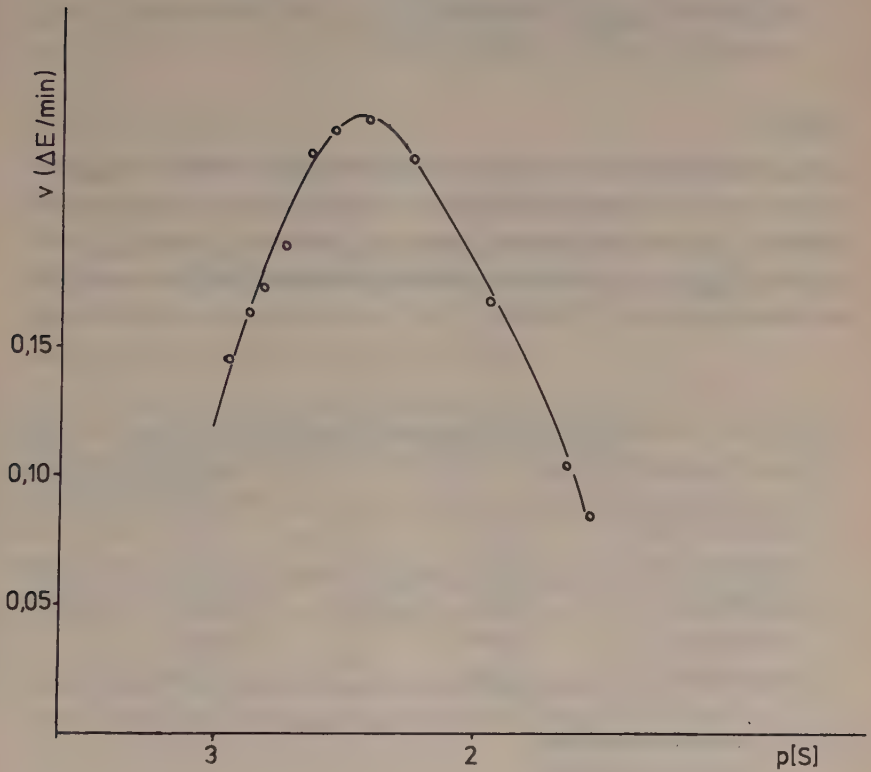


Abbildung 6

Substratumsatzkurve für Pheniticillin.

Die Umsatzgeschwindigkeit ($\Delta E/\text{min}$) ist gegen den negativen Logarithmus der Substratkonzentration $p[S]$ aufgetragen. Der Gipfel der Glockenkurve entspricht v_{opt} , die zugehörige Konzentration $[S]_{\text{opt}}$.

Die optimale Umsatzgeschwindigkeit v_{opt} wird graphisch ermittelt, ebenso der Wert der optimalen Substratkonzentration $[S]_{\text{opt}}$.

Aus diesen Werten werden

der Wert für K_m berechnet (Rechengang S. 86) und

der Wert für $K_{\text{ESS'}}$ (Rechengang S. 86), der Dissoziationskonstanten des ESS' Komplexes, ermittelt.

Tabelle 9

Optimale Substratkonzentrationen für kinetische Untersuchungen von Penicillinase mit verschiedenen Substraten, ermittelt aus Abb. 6 analogen Diagrammen. Aus den Werten für v_{opt} und $[S]_{\text{opt}}$ wurden K_m und V_{max} berechnet. $K_{\text{ESS'}}$ wurde graphisch ermittelt (siehe Ableitung im mathematischen Anhang).

	v_{opt} (nMol/min)	V_{max} (nMol/min)	S_{opt} μMol/l	K_m μMol/l	$K_{\text{ESS'}}$ μMol/l
Penicillin V K	7,10	11,4	186,2	56,4	614,8
Penicillin G Na	3,77	4,6	371,5	41,4	3332,4
Pheniticillin	7,02	16,7	269,2	187,1	387,3
Carbenicillin	5,89	- +)	162,2	- +)	- ++)
Dansylpenicillin	8,90	- +)	26,9	- +)	- ++)

+) = nicht zu berechnen

++) = nicht zu ermitteln

2. Kompetitive Hemmung

Aufgrund der Hemmwirkung der einzelnen Penicilline auf Penicillinase Riker soll geklärt werden, wie sich die Aktivität des Enzyms ändert, wenn als Substrat ein penicillinase-empfindliches Penicillin und als Inhibitor ein penicillinase-resistentes oder penicillinase-festes Penicillin angeboten wird.

Prinzip der Methode:

Verschiedene Substratkonzentrationen im Bereich von 20 - 200 $\mu\text{Mol/l}$ werden eingesetzt und die Aktivität des Enzyms bestimmt. Die Werte werden in ein Diagramm nach Lineweaver-Burk übertragen und $V_{\max}$ und K_m graphisch ermittelt. Anschließend werden die Messungen unter Zusatz des Inhibitors (Konzentrationsbereich 100 - 200 $\mu\text{Mol/l}$) wiederholt und die Ergebnisse in das gleiche Diagramm übertragen.

Die festgestellten Substrathemmungen ließen hier interessante Ergebnisse erwarten. Es war zu klären, ob sich je nach Variation des als Substrat bzw. als Inhibitor wirkenden Penicillins auch der Hemmungstyp ändert.

In dem ersten Versuch wurde Pheniticillin (penicillinase-empfindlich) als Substrat und Nafcillin (penicillinase-resistent) als Inhibitor eingesetzt.

Das Ergebnis zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 7): Nafcillin wirkt als kompetitiver Hemmstoff.

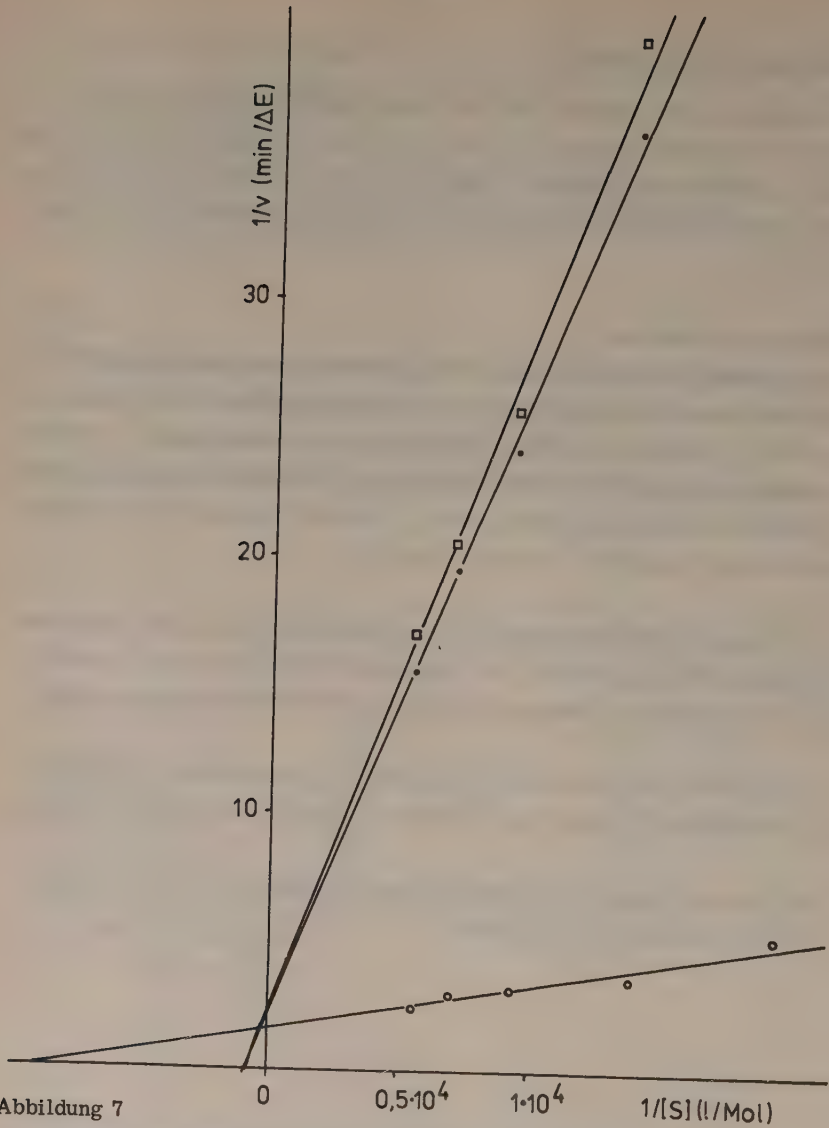


Abbildung 7

Kompetitive Hemmung von Penicillinase durch Nafcillin (I).

Substrat: Pheniticillin (S)

- — ○ ungehemmte Reaktion
- — □ $[I] = 52,5 \mu\text{Mol/l}$
- — • $[I] = 65,7 \mu\text{Mol/l}$

3. Nichtkompetitive Hemmung

Im zweiten Versuch wurde Benzylpenicillin (penicillinase-empfindlich) als Substrat und Cloxacillin (penicillinase-fest) als Inhibitor eingesetzt.

Das Ergebnis zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 8):

Cloxacillin wirkt als nichtkompetitiver Hemmstoff; ähnlich wirken Dicloxacillin und Flucloxacillin.

Eine Inhibitorkonstante konnte mit Hilfe der Auftragung nach Dixon (Abb. 9) nicht ermittelt werden, da die Punkte nicht auf einer Geraden lagen und somit kein Schnittpunkt ermittelt werden konnte. Bei höheren Inhibitorkonzentrationen ergab sich mit abnehmender Substratkonzentration zunehmende Abweichung von der Geraden.

In zwei weiteren Versuchen wurden Pheniticillin und Carbenicillin als Substrate, Cloxacillin als Inhibitor eingesetzt.

Es ergab sich ein zunehmender Übergang zum unkompetitiven Hemmungstyp, wie Abb. 10 zeigt.

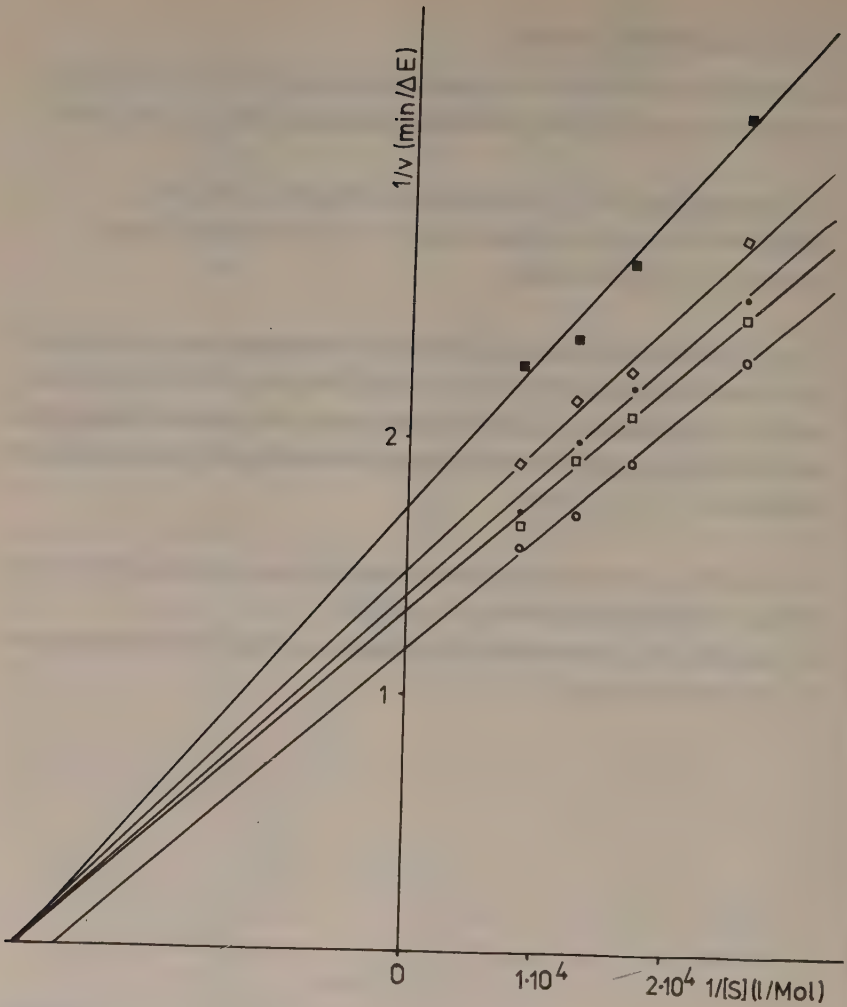


Abbildung 8

Nichtkompetitive Hemmung von Penicillinase Riker durch Cloxacillin (I)
 Substrat: Benzylpenicillin (S)

- — ○ ungehemmte Reaktion
- — □ $[I] = 97,9 \mu\text{Mol/l}$
- — • $[I] = 122,3 \mu\text{Mol/l}$
- ◇ — ◇ $[I] = 146,8 \mu\text{Mol/l}$
- — ■ $[I] = 195,7 \mu\text{Mol/l}$

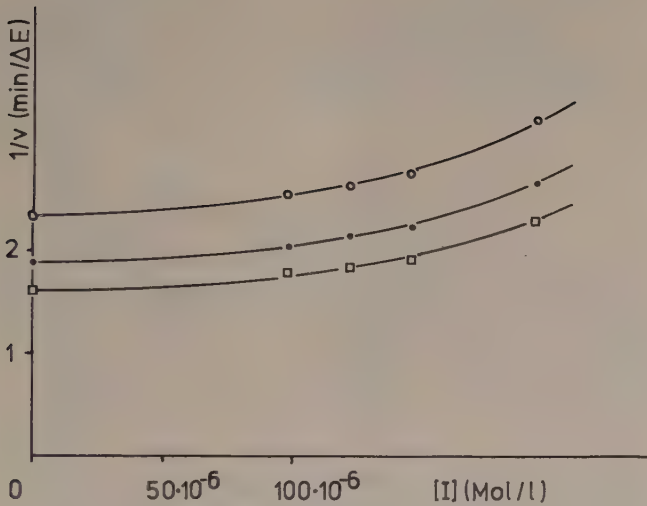


Abbildung 9

Dixon - Darstellung der (nichtkompetitiven) Hemmung von Penicillinase Riker durch Cloxacillin (I).

Substrat: Benzylpenicillin (S)

□ — □	[S] = 100 μMol/l
• — •	[S] = 62,5 μMol/l
○ — ○	[S] = 38,5 μMol/l

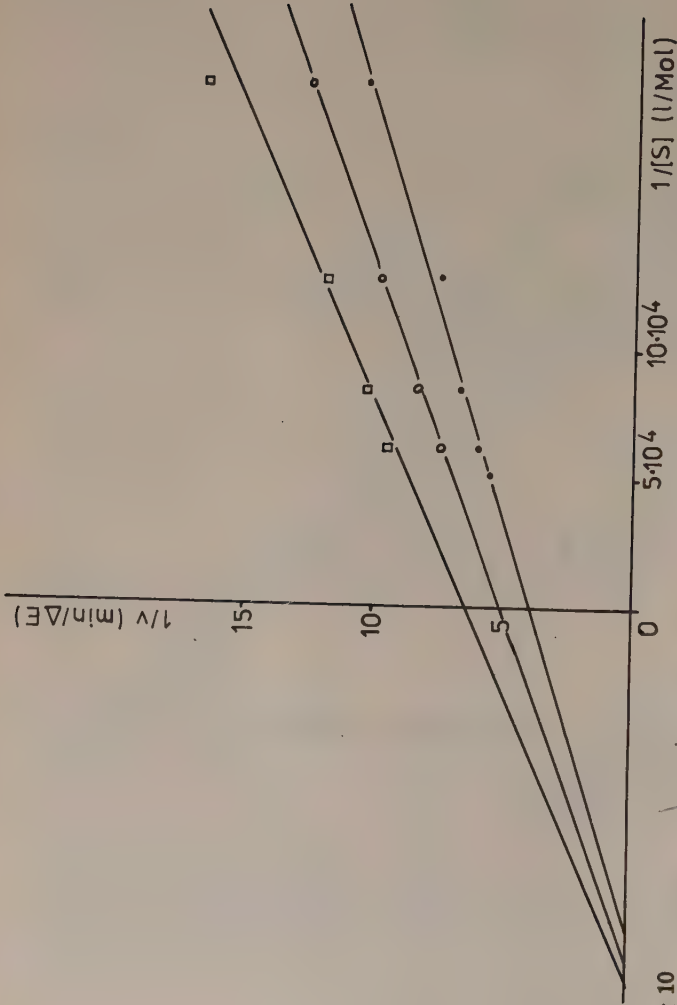


Abbildung 10

Lineweaver-Burk Diagramm für die Hemmung von Penicillinase durch Cloxacillin (I). Substrat: Carbenicillin (S)

- —•—• ungehemmte Reaktion
- —□—□ $[I] = 195, 7 \mu\text{Mol/l}$
- —○—○ $[I] = 122, 3 \mu\text{Mol/l}$

V. Darstellung, Charakterisierung und antibakterielle Wirksamkeit von Dansylpenicillin

1. Darstellung

Dansylpenicillin wurde aus 6-Aminopenicillansäure und Dansylchlorid synthetisiert (vergl. Methoden S. 79)

Bei dem Syntheseprodukt handelt es sich um lockere weiße Nadeln, die bei Betrachtung im Fluotestgerät (Hanau) bei $\lambda_{\text{excit}} = 366 \text{ nm}$ hellblau fluoreszieren. Bei Betrachtung mit diesem Gerät fluoresziert die neutrale wäßrige Lösung des Reaktionsprodukts orange, die alkalische Lösung gelb - grün.

2. Charakterisierung

a) Dünnschichtchromatographie

Während der Synthese wurden Reaktionskontrollen durch Dünnschichtchromatographie durchgeführt, wobei als Referenzsubstanzen Dansylchlorid, Dansylsäure und Dansylamid sowie 6-Aminopenicillansäure eingesetzt wurden. Die Detektion erfolgte im Fluotestgerät (Hanau) bei $\lambda_{\text{excit}} = 366 \text{ nm}$. Die R_F Werte sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Eine dritte chromatographische Untersuchung wurde durchgeführt, um das chromatographische Verhalten von Dansylpenicillin mit anderen Penicillinen zu vergleichen. Biagi et al (65) beschrieben eine Methode zur Dünnschichtchromatographie von Penicillinen, wobei sie eine Beziehung zwischen der Struktur der Seitenkette des jeweiligen Penicillins und dem Verteilungskoeffizienten (mobile und stationäre Phase) der verwendeten Penicilline ableiteten. Da Dansylpenicillin auf Grund seiner Struktur und seines chemischen Verhaltens zu den weniger hydrophilen Penicillinen gerechnet werden muß, sollte und konnte diese Überlegung durch eine chromatographische Untersuchung nach der oben beschriebenen Methode belegt werden. Als Referenzsubstanzen wurden Carbenicillin und Oxacillin (siehe Tabelle 11) eingesetzt.

Tabelle 10

R_F Werte für die an der Reaktion beteiligten bzw. entstehenden Substanzen in zwei verschiedenen chromatographischen Systemen.

System I: Platte beschichtet mit Kieselgel G. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Chloroform (65 Teile), Methanol (25 Teile) und Wasser (4 Teile) verwendet.

System II: Platte beschichtet mit Kieselgel G. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Chloroform (15 Teile), Methanol (4 Teile) und Essigsäure (1 Teil) verwendet.

Substrat	R_F System I	R_F System II
Dansylchlorid	0,78	0,85
Dansylsäure	0,32	0,25
Dansylamid	0,60	0,8
Dansylpenicillin	0,70	0,70
Dansylpenicillosäure	-	0,60
6-Aminopenicillansäure	0,15	0,25

Tabelle 11

R_F Werte für Dansylpenicillin und -penicillosäure.

System III: Platte beschichtet mit Kieselgel G, die imprägniert wurde mit Silikon DC 200 (350 cS); als Fließmittel wurde bei System III a Natriumacetat - Veronalpuffer pH 7,4 mit einem Acetonanteil von 6 %, in System III b mit einem Acetongehalt von 10 % verwendet (65).

Substrat	R_F System III a	R_F System III b
Carbenicillin	0,85	0,90
Oxacillin	0,50	0,55
Dansylpenicillin	0,25	0,30
Dansylpenicillosäure	0,80	0,85

Die Detektion erfolgte wiederum im Fluotestgerät (Hanau) bei

$\lambda_{\text{excit}} = 365 \text{ nm}$. Oxacillin konnte bei dieser Wellenlänge als bläulich fluoreszierende Substanz identifiziert werden. Carbenicillin wurde mit Ninhydrinreagenz nachgewiesen.

b) UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden im Wellenlängenbereich zwischen 360 und 220 nm aufgenommen, wobei sämtliche Parameter außer dem pH Wert konstant gehalten wurden (Abbildung 11).

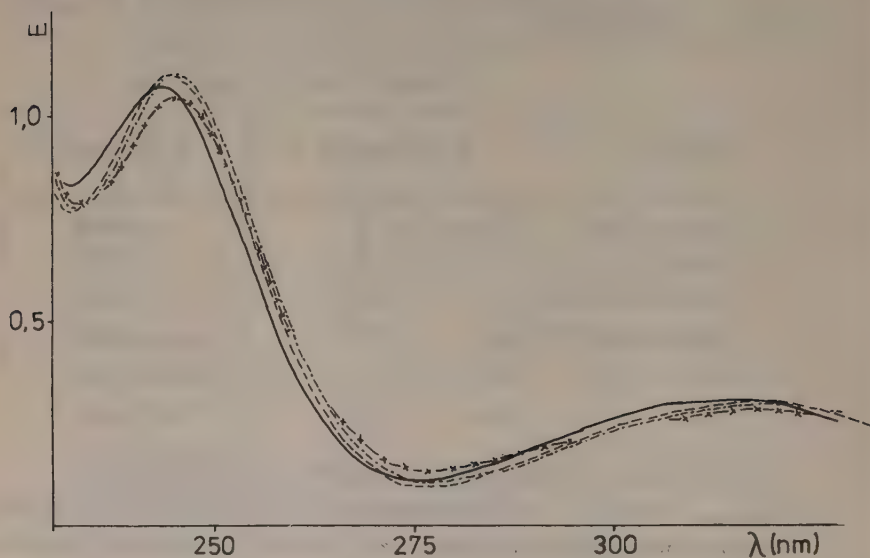


Abbildung 11

UV-Spektren von Dansylpenicillin bei unterschiedlichen pH Werten.

Aufgetragen ist die Extinktion gegen die Wellenlänge:

- ×—×—× Messung im Acetatpuffer pH 5
- · — · Messung im Phosphatpuffer pH 6
- — — Messung im Phosphatpuffer pH 7
- — — Messung im Phosphatpuffer pH 8

Die Substanz zeigt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 243 \text{ nm}$, ein weiteres bei $\lambda = 320 \text{ nm}$. Diese Maxima sind bei den untersuchten pH-Werten im gleichem Maße vorhanden, nur ist festzustellen, daß mit steigendem pH eine Verschiebung der Maxima zu den kürzeren Wellenlängen erfolgte. Das Absorptionsmaximum bei 243 nm erklärt auch die starke Eigenabsorption von Dansylpenicillin in $0,2 \text{ M}$ Phosphatpuffer pH 6, 8, die bei der Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten aufgefallen war.

Verdünt man die eingesetzte Lösung von Dansylpenicillin um den Faktor 10, so kann man noch ein drittes Absorptionsmaximum bestimmen, das bei der Wellenlänge $\lambda = 210 \text{ nm}$ liegt. Im Bereich zwischen 360 und 800 nm wurde keine Extinktion gefunden.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob sich das UV-Spektrum von Dansylpenicillin und seinem Hydrolyseprodukt, der Dansylpenicillosäure, unterscheidet. Diese Versuche wurden ebenfalls in Puffern von verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Das Hydrolyseprodukt Dansylpenicillosäure wurde durch enzymatische Spaltung von Dansylpenicillin in der Küvette erhalten.

Das Spektrum von Dansylpenicillosäure zeigt den gleichen Verlauf mit den gleichen Maxima wie das von Dansylpenicillin, nur sind die Maxima geringer und leicht zur kurzwelligen Seite hin verschoben. Analoge Beobachtungen konnten auch bei den anderen pH-Werten gemacht werden.

c) Fluoreszenzspektren

Zur Bestimmung des Fluoreszenzverhaltens von Dansylpenicillin wurden die Fluoreszenzspektren zwischen 700 und 300 nm bei verschiedenen Excitationsfrequenzen untersucht. Es zeigte sich, daß das Maximum für die Excitation bei $362,5 \text{ nm}$ liegt. Für diese Erregungsfrequenz zeigt das Fluoreszenzspektrum ein Maximum bei 550 nm .

Die Excitationsfrequenz von 362,5 nm wurde auch für die folgenden Untersuchungen zur Anregung benutzt.

Da bereits beim präparativen Arbeiten aufgefallen war, daß eine pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz besteht, wurde das Fluoreszenzspektrum bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen. Es wurde auch hier so verfahren, daß das Spektrum von Dansylpenicillin im Puffer mit definiertem pH-Wert vor und nach Zugabe von Penicillinase Riker aufgenommen wurde. Die Fluoreszenzspektren für Dansylpenicillin und Dansylpenicillosäure zeigten für die untersuchten pH-Werte gleiche Maxima, jedoch geringere Intensität.

Abbildung 12 läßt erkennen, daß

- a) mit zunehmender Acidität eine Abnahme der Emission eintritt,
- b) durch die enzymatische Hydrolyse ebenfalls eine Abnahme der Emission auftritt,
- c) das Emissionsmaximum von Dansylpenicillosäure bei gleichem pH gegenüber dem Maximum für Dansylpenicillin zur langwelligen Seite hin verschoben ist.

d) Infrarotspektroskopie

Das IR-Spektrum von Dansylpenicillin ist in Abbildung 13 wiedergegeben. Die bei 5,62 μm gemessene Absorption ist charakteristisch für alle Penicilline (66), da hier die Absorption der Carboxylgruppe des β -Lactamsystems liegt. Baxter et al (67) beschrieben, daß alle von ihnen untersuchten Sulfonamide zwei starke Banden bei Frequenzen von 1 160 cm^{-1} und 1 350 cm^{-1} zeigten, die eindeutig den symmetrischen und asymmetrischen Schwingungen der beiden S - O Bindungen zuzuordnen wären. Die Banden bei 1 155 cm^{-1} und 1 390 cm^{-1} sind als Schwingungen der SO_2 Gruppe zu deuten. Die Bande bei 1 612 cm^{-1} läßt sich als C = O-Anteil der Carboxylgruppe von Dansylpenicillin deuten (65). Nach Hydrolyse des β -Lactamrings ist die Bande bei 5,6 μm nicht mehr nachweisbar.

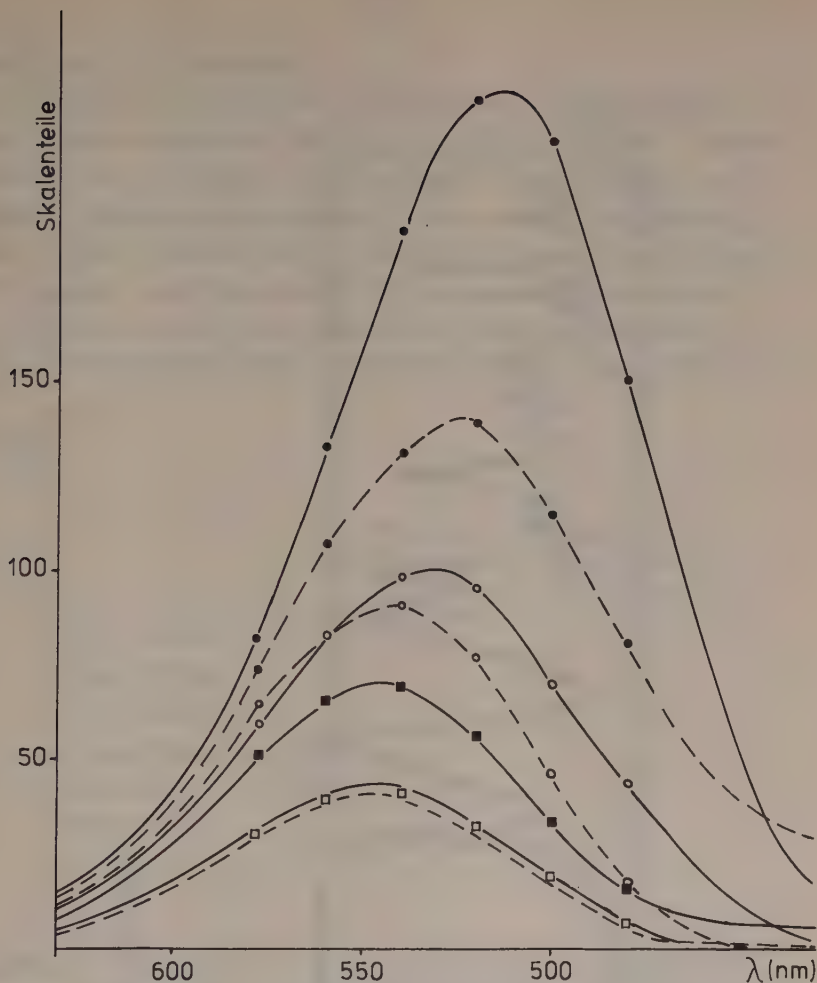


Abbildung 12

Ausschnitt der Fluoreszenzspektren von Dansylpenicillin und Dansylpenicillosäure ($\lambda_{\text{excit}} = 362,5 \text{ nm}$) bei verschiedenen pH-Werten.

Aufgetragen ist die Emission in Skalenteilen gegen die Wellenlänge in nm.

———— = Spektrum für Dansylpenicillin

----- = Spektrum für Dansylpenicillosäure

□ — □ = pH 4

■ — ■ = pH 7

○ — ○ = pH 8

● — ● = pH 9

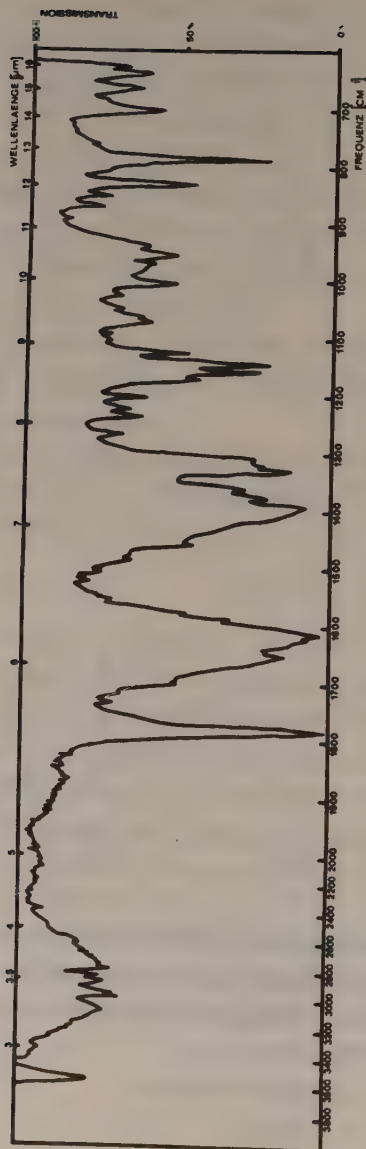


Abbildung 13
Infrarotspektrum von Dansylpenicillin.

3. Antibakterielle Wirksamkeit

Die Charakterisierung des Wirkspektrums wurde semiquantitativ durch den Platten-Diffusionstest mit *Bacillus subtilis* durchgeführt. In einem Versuch wurde die Wirkung von Dansylpenicillin auf einen hoch penicillinempfindlichen Keim untersucht. Hierbei sollte weiterhin geklärt werden, ob die Wirkung auf der β -Lactamstruktur oder auf der Sulfonamidkomponente des Moleküls beruht. Als Vergleichssubstanzen wurden Testblättchen für Penicillin G Natrium und ein Sulfonamidstandard auf den Agar aufgebracht. Tabelle 12 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Tabelle 12

	Hemmung	Hemmhofdurchmesser (cm)
Dansylpenicillin	+	1,2
Penicillin G Na	+	1,8
Dansylpenicillin + PAB	+	1,2
p-Aminobenzoesäure (PAB)	-	
Dansylpenicillin + Enzym	-	
Sulfonamid	+	0,6

Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, daß die antibiotische Wirkung von Dansylpenicillin auf einer intakten β -Lactamstruktur beruht, da nach Zusatz von Penicillinase keine Wachstumshemmung nachweisbar war. Ein Zusatz von p-Aminobenzoesäure zu Dansylpenicillin zeigte keinen Einfluß auf die antibakterielle Wirkung. Sollte die Sulfonamidkomponente allein für die Wachstumshemmung verantwortlich sein,

so müßte PAB, infolge des kompetitiven Effekts, die Hemmung vermindern bzw. aufheben. Gegen die Wirkung des Sulfonamids spricht auch die fehlende Hemmung durch enzymatisch hydrolysiertes Dansylpenicillin.

In einem weiteren Versuch wurde durch Plattendiffusionstest die Wirksamkeit von Dansylpenicillin auf unterschiedliche Keime untersucht (Tabelle 13).

Tabelle 13

Antibiotische Wirkung von Dansylpenicillin

Mikroorganismus	Hemmhofgröße für Dansylpenicillin (cm)	Hemmhofgröße für Penicillin G Na (cm)
Staphylococcus aureus SG 511	1	1,5
Staphylococcus epidermidis	1	2,1
Staphylococcus epidermidis 429	0,5	1,0
Staphylococcus aureus 446	0,3	0,4
Staphylococcus albus 407	1,1	2,0
Streptococcus 427	1,0	2,0
Escherischia coli	-	0,6
Klebsiella pneumoniae	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-

In weiteren semiquantitativen Versuchen wurde festgestellt, daß Dansylpenicillin auch eine Wachstumshemmung Penicillinase produzierender Keime bewirkte.

Aufgrund der mikrobiologischen Untersuchungen läßt sich Dansylpenicillin in die Gruppe der penicillinase-resistenten Penicilline einreichen; die gleiche Klassifizierung ergab sich bereits aufgrund der kinetischen Untersuchungen.

C) DISKUSSION

I. Analytik der Penicilline

1. Photometrische Gehaltsbestimmung von Penicillinen

Die in Tabelle 1a) als penicillinase-empfindlich aufgeführten Penicilline können mit der photometrischen Bestimmungsmethode (61) quantitativ bestimmt werden. Der prozentuale Gehalt lag mit Ausnahme von Pheniticillin zwischen 90 % und 98 %. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Forderungen des Deutschen Arzneibuchs (DAB VII) (68), das einen Mindestgehalt von Penicillin = 95% vorschreibt. Zu beachten ist, daß die Einwaagen von Penicillin in möglichst kurzer Zeit erfolgen, da die einzelnen Substrate unterschiedlich hygroskopisch sind. Sämtliche Substanzen sind daher vor der Messung mindestens zwei Tage im Exsikkator über P_2O_5 im Vakuum zu trocknen; die Luftfeuchtigkeit im Wägegehäuse kann durch frisch getrocknetes Silicagel niedrig gehalten werden. Nichtberücksichtigung dieser Voraussetzungen ergibt Fehler bis zu 10% und mehr.

Trotz Einhaltung dieser Vorsichtsmaßnahmen ergab sich für Carbenicillin, das schon vom Hersteller als stark hygroskopisch angegeben wurde, ein Gehalt von nur 89,3 %. Der mit etwa 82 % noch geringere Gehalt von Pheniticillin ist hierdurch jedoch nicht vollständig zu erklären. Vergleichsmessungen nach alkalischer Hydrolyse ergaben einen Gehalt von 87,5 %. Die untersuchte Charge kann also nur zu etwa 90 % aus Penicillin bestanden haben!

Die als penicillinase-resistent bezeichneten Penicilline (Tab. 1 b) lassen sich nach dieser Methode ebenfalls befriedigend nachweisen, nur muß vor Beginn der Rücktitration mit Cystein etwa 10 - 15 Min. gewartet werden. Oxacillin scheint nach diesen Ergebnissen eine Zwischenstellung zwischen den penicillinase-resistenten und penicillinase-festen Substraten einzunehmen.

Die penicillinase-festen Substrate (Tab. 1c, Tab. 2) können mit der photometrischen Methode quantitativ nur nach vorhergehender

alkalischer Hydrolyse (Tab. 2) bestimmt werden, was allerdings den Verlust der Spezifität dieser Methode zur Folge hat. Auch eine längere Einwirkung der Penicillinase (180 Min.) erlaubte keine quantitative Bestimmung, während mit der alkalischen Spaltung nach 1 Stunde (69) eine quantitative Hydrolyse des β -Lactamrings erzielt werden kann. Kontrollansätze ohne Enzym ergaben keine nennenswerte Spontanhydrolyse.

2. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten der gebildeten Mercaptide - Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes

Zur Untersuchung der Enzymaktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen ist es notwendig, den Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes zu ermitteln und den molaren Extinktionskoeffizienten für die gebildeten Mercaptide zu bestimmen. Um die starke Absorption des pCMB bei der Meßstrahlung von 250 nm auszuschalten, wurden alle Messungen gegen pCMB Lösungen gleicher Konzentration durchgeführt. Mit Ausnahme von Dansylpenicillin lag der obere Konzentrationsbereich, in dem die Meßwerte noch auf einer Geraden liegen, bei 12,5 - 15 $\mu\text{Mol/l}$, während er sich bei Dansylpenicillin bis zu 18 $\mu\text{Mol/l}$ erstreckte.

Alle Untersuchungen wurden in Abwesenheit von pCMB wiederholt, um die Eigenabsorption der Substrate in Puffer zu überprüfen. Nur die Naphthalinderivate der 6-Aminopenicillansäure zeigten eine nennenswerte konzentrationsabhängige Eigenabsorption bei 250 nm, so daß die Extinktion des gebildeten Mercaptids um den Wert der Eigenextinktion in Puffer korrigiert werden mußte (Tab. 4).

Dazu wurden die Werte der Steigungen der beiden berechneten Regressionsgeraden voneinander subtrahiert und aus der so erhaltenen Differenz der Extinktionskoeffizient des Mercaptids errechnet.

Die Werte der molaren Extinktionskoeffizienten liegen für die zur Untersuchung eingesetzten Substrate zwischen $8 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ und $10 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$. Die Indikatorreaktion auf Penicillosäure verläuft nach folgendem Schema (Abb. 14).

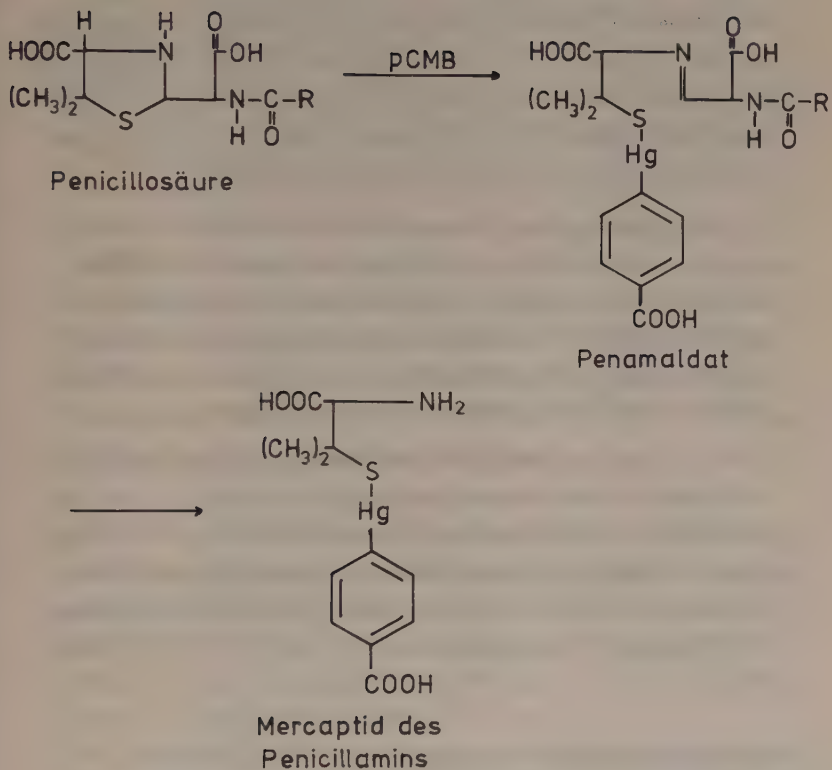


Abbildung 14

Reaktion der Penicillosäure mit pCMB.

Nach Woodward (70) verläuft die Reaktion von Penicillosäure mit HgCl_2 über ein Zwischenprodukt, das durch eine hohe Lichtabsorption bei 280 nm charakterisiert ist. Dieses Penamaldat reagiert je nach Versuchsbedingungen weiter zum Mercaptid des Penicillamins. Der entsprechende Reaktionsverlauf für Penicillosäure mit pCMB konnte unter Nachweis eines Zwischenprodukts, das ebenfalls eine hohe Lichtabsorption aufwies, bestätigt werden (61).

Aus den annähernd übereinstimmenden molaren Extinktionskoeffizienten der untersuchten Derivate der 6-Aminopenicillansäure kann geschlossen werden, daß die Spaltung des Penamaldats unter den verwendeten Versuchsbedingungen vollständig ist. Gemessen wird bei diesen Versuchsbedingungen als gemeinsames Reaktionsprodukt jeweils nur das Mercaptid des Penicillamins.

Unter der Annahme, daß die Unterschiede der molaren Extinktionskoeffizienten auf dem unterschiedlichen Reinheitsgrad, der Hygroscopicität der Substanzen und der statistischen mittleren Abweichung der Meßwerte beruhen, läßt sich ein Mittelwert berechnen, der bei $9,2 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ liegt. Dieser Wert entspricht etwa dem für Natriumpenicilloat bestimmten Wert von $8,95 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ (62).

II. Charakterisierung der Penicillinase

Die Penicillinasen (β -Lactamasen E.C. 3. 5. 2. 6) sind Enzyme, die unter den verschiedensten Bakterienarten weit verbreitet sind (13, 71), wobei auch bei gleichen Gattungen unterschiedliche Formen vorkommen, die sich zwar in ihren enzymatischen Eigenschaften weitgehend unterscheiden, nur wenig jedoch in ihrer Primärstruktur (72). Obwohl bei den einzelnen Gattungen Unterschiede in der Aminosäuresequenz gesichert sind, gibt es dennoch verschiedene chemische Ähnlichkeiten für die β -Lactamasen von Gram-positiven Arten (71, 73). Dazu gehört u. a. das vollständige Fehlen von Cystein,

was hier von besonderem Interesse ist, da die enzymatisch-photo-metrische Nachweismethode auf der Bestimmung von Thiolgruppen mit einem SH-Reagenz beruht. Ferner gibt dieses Fehlen von Schwefelatomen in der Aminosäurekette einen Hinweis auf die Struktur des Enzyms, das nur aus einer Polypeptidkette bestehen kann, da keine Ausbildung von Disulfidbrücken möglich ist (61, 73, 74). Aufgrund dessen konnte eine weitgehende Variabilität der Tertiärstruktur vermutet werden, die auch von Citri und Garber (75, 76) diskutiert wurde. Für eine vom Substrat induzierende Änderung der Struktur eines Enzyms wurde der Begriff "Conformative response" geprägt (77). Das am häufigsten für diese Untersuchung herangezogene Enzym wurde aus *Bacillus cereus* Kulturen gewonnen, so daß man aus den oben angeführten Ähnlichkeiten innerhalb einer Spezies ein ähnliches Verhalten für die von mir verwandte Penicillinase Riker annehmen konnte.

Da für die Penicillinase nach l. c. (78) die Michaelis-Menten-Kinetik (79) als gültig angenommen wird, wurden für die in Tab. 1a) als enzymatisch bestimmbar angegebenen Penicilline nach der in II b) aufgeführten Methode die Werte von $V_{\max}$ und K_m bestimmt. Für die in Tabelle 6 aufgeführten Substrate wurden die Konzentrationen zwischen 20 und 200 $\mu\text{Mol/l}$ variiert.

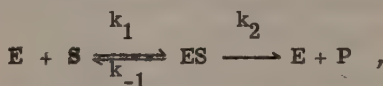
Die Messungen, die bei einem etwa um den Faktor 10 niedriger liegenden Konzentrationsbereich durchgeführt werden mußten, sind hinsichtlich ihrer Aussagekraft etwas geringer zu werten, da die eingesetzten Substratkonzentrationen nicht den für die Charakterisierung der Kinetik erforderlichen Substratbereich (bis annähernd 100 % Substratsättigung) überstreichen.

Für Nafcillin wurde bei Substratkonzentrationen gemessen, bei denen die Umsatzgeschwindigkeiten zwischen 45 % und 80 % der nach Lineweaver-Burk extrapolierten Maximalgeschwindigkeit lagen. Dies war erforderlich, da Nafcillin eine hohe Eigenextinktion besitzt.

Für Ampicillin lag die Umsatzgeschwindigkeit zwischen 13 % und 43 % von $V_{\max}$, für Pheniticillin zwischen 20 % und 60 % von $V_{\max}$. Für diese Substrate lag der limitierende Faktor in der Spontanhydrolyse.

Für Dansylpenicillin lagen die Geschwindigkeitswerte zwischen 16 % und 45 % von $V_{\max}$, allerdings war hier der limitierende Faktor die schon frühzeitig einsetzende Substratüberschußhemmung.

Geht man von folgendem Schema aus



Schema 1

wobei $K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} ,$

und deutet man den Wert für die Michaeliskonstante als Größe für die Affinität des Enzyms zum Substrat, so fällt auf, daß 2 Penicilline der penicillinase-resistenten Gruppe, Nafcillin und Dansylpenicillin, eine größere Affinität zur verwendeten Penicillinase haben, als z.B. die als hoch empfindlich bekannten Penicilline. Legt man die Theorie zugrunde, daß das Substrat in das aktive Zentrum des Enzyms wie ein Schlüssel in ein Schloß paßt (80), und ein anderes Substrat mit anderer sterischer Konformation eine stärkere oder geringere Affinität aufweist, so erscheint dieses Ergebnis außerhalb der Erwartung, da die Naphthalinderivate sich von Benzolderivaten sterisch unterscheiden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen für Dansylpenicillin und Nafcillin lassen sich mit der "induced fit" Hypothese (81) verständlich darlegen. Die Anlagerung des Substrats würde in diesem Fall einen negativen Effekt auf die für die Katalyse verantwortlichen Gruppen im Enzym ausüben, eine Beobachtung, die auch Citry diskutiert (82).

Bei einem Vergleich der von mir gemessenen K_m - und ermittelten V_{max} - Werte mit denen der Literatur, ist zu berücksichtigen, daß wir nicht mit einem selbstgereinigten und charakterisierten Enzym, sondern mit einem Handelspräparat für medizinische Zwecke arbeiteten. Weiter ist zu beachten, daß die in der Literatur angegebenen Werte

1. bei verschiedenen und unterschiedlichen pH-Werten,
2. bei verschiedenen und unterschiedlichen Temperaturen,
3. mit verschiedenen und unterschiedlichen Methoden und
4. an verschiedenen und unterschiedlichen Enzympräparaten

ermittelt wurden.

Meine Ergebnisse gestatten einen Vergleich der Betrachtung der verschiedenen Substrate für ein- und dasselbe Enzympräparat, da die hier oben genannten Parameter für alle Untersuchungen konstant gehalten wurden.

III. Differenzierung der Penicilline

Eine Klassifizierung in die im Abschnitt I behandelten Gruppen (Tab. 1a - c) ist aus den K_m -Werten allein nicht sinnvoll möglich. Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, kann erst anhand der für das jeweilige Substrat ermittelten Aktivität, die sich aus den entsprechenden Lineweaver-Burk Diagrammen ermitteln läßt, eine Angabe in internationalen Enzymeinheiten gemacht werden. Diese Angaben in Tabelle 8 sind bezogen auf die von Kettelhack-Riker gelieferte Ampulle (800 000 Levy-Einheiten). Es ist aus der folgenden Diskussion verständlich, daß nur die Angabe internationaler Enzymeinheiten, bezogen auf das jeweilige Substrat, der für die Klinik relevante Schlüssel des therapeutischen Einsatzes von Penicillinase sein kann. Folgende Klassifikation der untersuchten Substrate wird vorgeschlagen:

Penicillin	mit dem Penicillin ermittelte Aktivität
Penicillinase empfindlich	> 150 IU/Ampulle
Penicillinase wenig empfindlich	50 - 150 IU/Ampulle
Penicillinase resistent	< 10 IU/Ampulle
Penicillinase fest	- IU/Ampulle

Dieses Ergebnis sollte von klinischem Interesse sein, da Penicillinase Riker als Medikament zur Behandlung von Penicillinallergie eingesetzt wird (39).

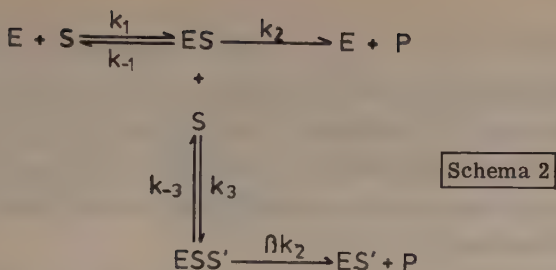
Bei der therapeutischen Verwendung des Enzyms ist es nach den vorliegenden Ergebnissen erforderlich, anamnestisch zu eruieren, welche Penicillinpräparate dem Patienten in welcher Dosierung verabreicht wurden. Unter Beachtung der zusätzlichen Faktoren wie Verteilung, Resorption, Ausscheidung, sowohl von Penicillin als auch von Penicillinase, kann man die Wirksamkeit einer Penicillinaseinjektion für den konkreten Fall vorausbestimmen.

Nach den beschriebenen Ergebnissen erscheint eine therapeutische Anwendung von Penicillinase Riker nur bei allergischen Reaktionen, die durch penicillinase-empfindliche Penicilline (Penicillin G, Penicillin V, Pheneticillin) hervorgerufen wurde, angebracht.

IV. Hemmungstypen der Penicillinase

Wird die Aktivität von Penicillinase Riker auch bei höheren Substratkonzentrationen untersucht, so ist eine mit steigender Substratkonzentration zunehmende Abnahme der Umsatzgeschwindigkeit zu erkennen. Die Darstellung im Lineweaver-Burk-Diagramm ergibt den Hemmungstyp einer Substratüberschußhemmung.

Dieser Hemmungstyp läßt sich im einfachsten Fall so erklären, daß zwei verschiedene Stellen an dem Enzym existieren, die Substrat binden.



Unter Einbeziehung sämtlicher in diesem Reaktionsschema auftretenden Geschwindigkeitskonstanten ergibt sich die Gleichung für die Umsatzgeschwindigkeit zu

$$v = \frac{V_{\max} \cdot K'_m [S] + \beta V_{\max} \cdot [S]^2}{K_m \cdot K'_m + K_m [S] + [S]^2} \quad \boxed{\text{Gleichung 1}}$$

Für Gleichung 1 bedeuten:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad K'_m = \frac{k_{-3} + \beta k_2}{k_3}$$

Für den Grenzfall $\beta = 0$, d. h. der ESS'-Komplex ist katalytisch inaktiv und zerfällt nicht in ES' und P, gilt:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{\text{ESS}'}}} \quad \boxed{\text{Gleichung 2}}$$

Für Gleichung 2 gilt:

$$K_{\text{ESS}'} = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

$K_{\text{ESS}'}$ ist die Dissoziationskonstante des ESS'-Komplexes.

Überträgt man die Meßwerte nach der Gleichung

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max} \cdot K_{\text{ESS}'}} \cdot [S] \quad \boxed{\text{Gleichung 3}}$$

in ein Diagramm analog Lineweaver-Burk, kann man aus den Punkten, die im linearen Bereich der Kurve liegen, den Wert für

$\frac{1}{V_{\max}}$ extrapolieren und $-\frac{1}{K_m}$ graphisch ermitteln. Ebenso ist der Bereich bestimmbar, bei dem eine Hemmung des Enzyms durch ein Substrat vorliegt. Durch das Vorliegen einer Substratüberschußhemmung läßt sich bereits aussagen, daß das Enzym außer seinem aktiven Zentrum eine weitere Bindungsstelle für das Substrat besitzt, die konzentrationsabhängig besetzt wird.

Wird nun die Umsatzgeschwindigkeit v des Enzyms gegen den Logarithmus der zugehörigen Substratkonzentration aufgetragen, so ist aus der graphischen Darstellung der Wert für die optimale Substratkonzentration ($[S]_{\text{opt}}$), bei der das Enzym eine optimale katalytische Aktivität (v_{opt}) besitzt, direkt zu ermitteln. Aus dieser Kurve lassen sich nach Gleichung 2 und aus der Beziehung

$$V_{\max} = v_{\text{opt}} \left(1 + 2 \frac{K_m}{[S]_{\text{opt}}} \right) \quad \boxed{\text{Gleichung 4}}$$

die Werte für $V_{\max}$ und K_m berechnen. Diese Gleichung hat gegenüber der früher gebrauchten Gleichung den Vorteil, daß zur Bestimmung von K_m nicht nur die Werte bei geringer Substratkonzentration herangezogen werden, sondern daß K_m aus sämtlichen Werten, auch aus denen im Hemmbereich, bestimmt werden kann.

Tabelle 14 gibt eine Gegenüberstellung der nach beiden Gleichungen bzw. Darstellungen ermittelten K_m -Werte.

Tabelle 14

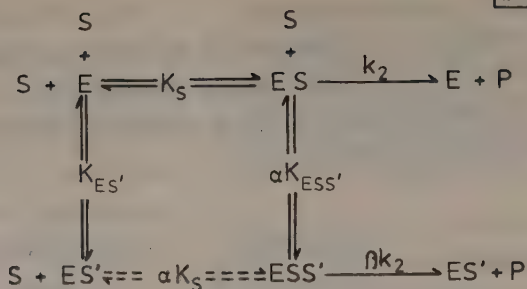
Michaelis-Konstanten von Substraten, für die eine Substrathemmung gesichert werden konnte. Die aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelten K_m -Werte sind denen aus der logarithmischen Darstellung (Glockenkurve) gegenübergestellt.

Substrat	K_m ($\mu\text{Mol/l}$) Lineweaver-Burk	K_m ($\mu\text{Mol/l}$) Glockenkurve
Penicillin G Na	40, 3	41, 4
Penicillin V K	40, 8	56, 4
Pheneticillin	143, 0	187, 1
Carbenicillin	88, 5	- +)
Dansylpenicillin	29, 85	- +)

+) = nicht bestimmbar.

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich ist, ist der Unterschied für Penicillin G Natrium und Penicillin V Kalium als innerhalb der Fehlergrenzen liegend zu vernachlässigen. Dieses Ergebnis läßt sich dahingehend interpretieren, daß durch die Bindung des Substrats an die zweite Haftstelle zwar eine Beeinträchtigung der Aktivität (Tab. 9), jedoch keine Änderung der Affinität (Tab. 14) entsteht. Betrachtet man die Werte der Konstanten der beiden bindenden Stellen (K_m und $K_{ESS'}$) so fällt auf, daß der Wert für $K_{ESS'}$ für Penicillin G Natrium etwa fünf mal größer ist als für Penicillin V Kalium (Tab. 9). Für Pheneticillin ist festzustellen, daß die Affinität (Tab. 9) zur zweiten Haftstelle noch größer ist. Gleichzeitig wird auch eine Beeinflussung der Affinität des aktiven Zentrums von Enzym zu Substrat durch einen größeren K_m -Wert deutlich. Das eingangs aufgestellte Schema 2 muß zur Erklärung der Vorgänge erweitert werden.

Schema 2. 1



ES' bedeutet den Komplex aus Substrat und nicht katalytisch aktiver Stelle des Enzyms. Diese Verbindung ist katalytisch inaktiv, d. h. $\beta = 0$.

Die Substratüberschußhemmung ist dem Typ nach eine unkompetitive Hemmung, da das zweite Substrat mit dem ES-Komplex reagiert. Im Fall von Pheniticillin als Substrat geht sie zum Typ einer nicht - kompetitiven Hemmung über, d. h. die Anlagerung des Substrats ist an die katalytisch aktive und an die katalytisch nicht aktive Stelle gleichgut möglich. Im Grenzfall ist $\alpha = 1$. Als Beweis hierfür kann man die Annäherung der Werte von $K_{\text{ESS}'}$ und K_m verstehen, wobei eine Absicherung dieser Hypothese nur durch Relaxationskinetik oder Messung im pre steady state möglich wäre. Die einfache, bisher angewendete Michaelis-Menten-Kinetik darf also nicht mehr benutzt werden. Man kann zwar aus dem für die einzelnen Substratkonzentrationen bestimmten Aktivitäten aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm einen K_m -Wert graphisch ermitteln, darf diesen aber nicht als Michaeliskonstante bezeichnen. Bei der Auftragung von Substratkonzentration gegen den Reziprokwert der Geschwindigkeit ($\frac{1}{v} - [S]$) schneidet die durch die Meßwerte gelegte Gerade die Ordinate in einem negativen Wert. Diese Tatsache läßt sich ebenfalls erkennen, wenn man die Werte von

v_{opt} und $[S_{\text{opt}}]$ in die Gleichung

$$V_{\text{max}} = v_{\text{opt}} \cdot \frac{[S_{\text{opt}}]^2}{[S_{\text{vopt}}/2] \cdot [S_{\text{opt}}] - 4} + 1 \quad \text{Gleichung 8}$$

einsetzt und infolgedessen V_{max} negativ wird.

Der graphisch ermittelte Wert ist also nicht als K_m -Wert zu bewerten, sondern ist eine Konstante von komplexerer Natur. Die Anwendbarkeit der Michaelis-Menten-Kinetik nimmt mit Annäherung von K_{ESS} an K_m zunehmend ab.

Auffallend ist, daß es sich bei den Substraten, die eine höhere Affinität zur nicht katalytischen Bindungsstelle haben, um Ladungsträger handelt. Carbenicillin besitzt eine zweite Carboxylgruppe, Dansylpenicillin liegt bei dem pH = 6,8, bei dem die Messungen vorgenommen wurden, protoniert vor.

Die Annäherung der Affinitäten für beide Bindungsstellen bei entgegengesetzten Ladungen, läßt sich so erklären, daß bei Dansylpenicillin die Affinität zum katalytischen Zentrum aufgrund der positiven Ladung vermindert ist, K_m wird zwar zu 29,8 $\mu\text{Mol/l}$ gefunden, jedoch handelt es sich hier um eine Mischkonstante, in die auch K_{ESS} eingeht. Substrathemmung tritt für Dansylpenicillin bereits in einer um eine Zehnerpotenz geringeren Konzentration ein. Das läßt auf eine relativ große Anlagerungstendenz an die nicht katalytische Stelle schließen. Diese Beobachtung wird von Depue et al (83) bestätigt, die in ihren Untersuchungen an α -Aminobenzylpenicillin, p-Aminobenzylpenicillin und 6-Aminopenicillansäure feststellten, daß eine positive Ladung die Affinität zum katalytischen Zentrum vermindert.

Bei Carbenicillin, das eine negative Ladung trägt und in der $v - p[S]$ - Darstellung ein identisches Bild zeigt, läßt sich das Hemmverhalten ebenfalls nicht durch eine einfache Kinetik beschreiben. Es ist nur so zu deuten, daß auch hier die Affinität zur zweiten Bindungsstelle groß ist, und auf diese Weise die Annäherung der Werte für K_m und K_{ESS} resultiert.

Eine Unterstützung der Hypothese, daß Penicillinase zwei Bindungsstellen besitzt, findet sich in der Arbeit von Csanyi et al (84). Die von ihnen durchgeführten Untersuchungen der Penicillinase von *Bacillus cereus* 569/H gegenüber Pyrazocillin führten zu einem gemischten Hemmungstyp. Sie postulierten aus ihren Ergebnissen eine zweite Bindungsstelle, die nicht katalytisch aktiv ist und einen nur losen Einfluß auf das katalytisch aktive Zentrum ausübt.

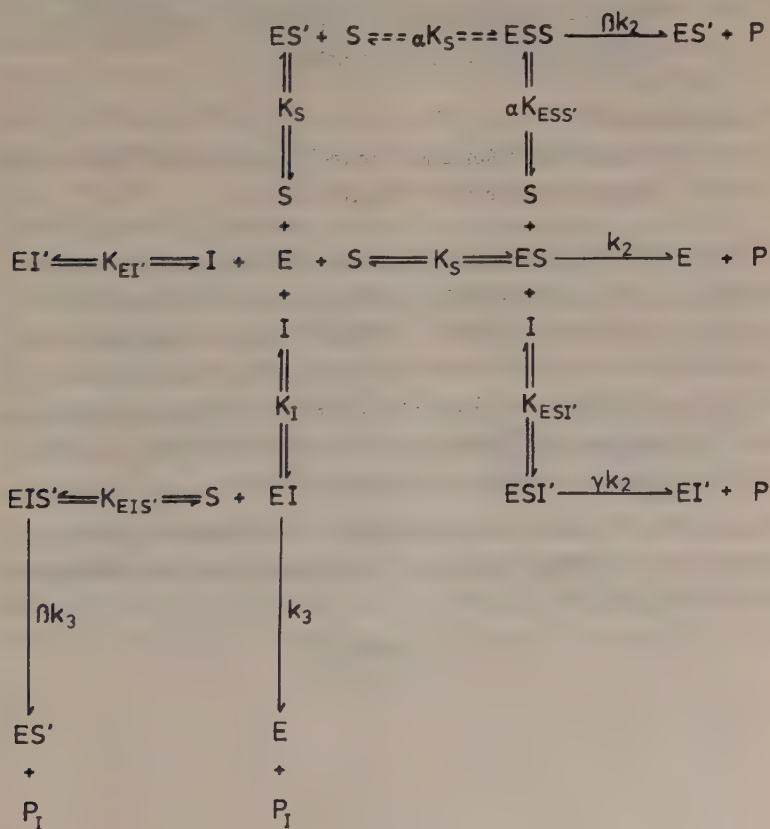
Da aus meinen Ergebnissen über die Substrathemmung neben der katalytisch aktiven Stelle mindestens eine weitere Bindungsstelle gefordert werden kann, wurde weiterhin untersucht, welchen Einfluß die penicillinase-festen Penicilline auf das verwendete Enzym haben und welche Rolle die zweite Bindungsstelle ggf. hierbei spielt.

Citri (82, 85) und andere Autoren (86, 87) konnten zeigen, daß Methicillin und Oxacillin durch das Enzym wesentlich langsamer hydrolysiert wurden als penicillinase-empfindliche Substrate, z.B. Benzylpenicillin, und daß sie die Reaktion der Penicillinase mit Benzylpenicillin im Sinne einer kompetitiven Hemmung beeinflussen. Nafcillin, das zur Gruppe der penicillinase-resistenten Penicilline gehört, zeigte in meinen Versuchen eine kompetitive Hemmung auf die Hydrolyse von Phenethicillin. Da mit Phenethicillinkonzentrationen, bei denen keine Substrathemmung durch Phenethicillin meßbar war, gearbeitet wurde, konnte eine wesentliche Beeinflussung der Affinität des katalytischen Zentrums zum Substrat durch Besetzung der nicht katalytisch aktiven Bindungsstelle vernachlässigt werden.

So ergibt sich im Lineweaver-Burk-Diagramm ein kompetitiver Hemmungstyp. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß Nafcillin als kompetitiver Inhibitor am Enzym teilweise selbst hydrolysiert wird, was jedoch unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen nicht der Fall war.

In einem weiteren Versuch wurde mit Benzylpenicillin als Substrat der Einfluß penicillinase-fester Penicilline (am Beispiel von Cloxacillin) auf das Enzym untersucht. Es ergab sich eine nichtkompetitive Hemmung, die nach folgendem Schema interpretiert werden kann:

Schema 3



Dieses bedeutet für den vorliegenden Fall der Cloxacillinhemmung, daß der Hemmstoff mit der nicht katalytisch aktiven Bindungsstelle reagiert und die Aktivität des Enzyms beeinflusst. Formal wird das so symbolisiert, daß sich I sowohl an E als auch an ES anzulagern vermag.

Überträgt man die Meßwerte in ein Diagramm nach Dixon (88), vergl. Abbildung 9, so kann man folgendes feststellen:

1. Die Reziprokwerte der Geschwindigkeit für eine Substratkonzentration bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen liegen nicht auf einer Geraden.
2. Bei höheren Inhibitorkonzentrationen ergibt sich ein Abspringen der Kurve. Das bedeutet, daß die Reziprokwerte der Geschwindigkeiten bei größeren Inhibitorkonzentrationen nicht mehr linear zunehmen.

Daraus folgt, daß

3. dieser Effekt umso größer ist, je geringer die Konzentration des Substrats ist (vergl. Abb. 9).

Im Sinne der Koshlandschen Theorie (89) kann das bedeuten, daß der Inhibitor mit der nicht katalytisch aktiven Stelle reagiert und so die Aktivität des Enzyms beeinflusst. Dieser Effekt ist bei geringeren Substratkonzentrationen stärker ausgeprägt, was dahingehend interpretiert werden kann, daß der stabilisierenden Wirkung des Substrats eine Änderung der katalytischen Aktivität durch Besetzung der zweiten Bindungsstelle mit Inhibitor entgegenwirkt (91).

Eine weitere Untermauerung der Hypothese von mehreren Bindungsstellen für das Substrat erhält man, wenn man anstelle der Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

die Hill-Gleichung (20)
$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{K + [S]^n}$$

angewendet und die Werte für die einzelnen Substrate in die Hill-Darstellung überträgt. Aus der Steigung m der Geraden läßt sich eine Aussage über die Kooperativität der bindenden Stelle für das Substrat machen. Ist $m \neq 1$, so deutet das auf einen Kooperativitätseffekt hin (Abb. 16).

Auch die übrigen, mit der enzymatisch photometrischen Methode nachweisbaren Penicilline hatten einen Kooperativitätskoeffizienten von $m \neq 1$, was wiederum bedeutet, daß es sich um einen positiven kooperativen Effekt der bindenden Stellen für das Substrat handelt.

Für Penicillin G Natrium als Substrat sind diese Vorstellungen weitgehend zutreffend, da in Abwesenheit von Cloxacillin nachgewiesen werden konnte, daß es sich um ein leicht spaltbares Substrat handelt, das in dem Konzentrationsbereich, in dem gemessen wurde, seine eigene Affinität zum Enzym und seine eigene Hydrolyse nicht beeinflusst (vgl. Kapitel II). Komplizierter wird die Situation, wenn die Hemmung durch Cloxacillin mit Substraten der Gruppe untersucht wird, die je nach Molekül einen Einfluß auch auf die Affinität des katalytischen Zentrums ausüben (z. B. Pheneticillin, Carbenicillin), da hierbei eine Konkurrenz von Substrat und Inhibitor um die nicht katalytische Haftstelle vorliegt.

Im Lineweaver-Burk Diagramm (Abb. 10) ergibt sich das Bild einer Hemmung, die ihrem Charakter nach zwischen nichtkompetitiv und unkompetitiv anzuordnen wäre. Aus der Dixon-Darstellung (Abb. 9) folgt, daß die Konzentration des Inhibitors die Affinität des Substrats zum Enzym ändert. Bei Carbenicillin ist der Einfluß auf die Struktur des Enzyms bereits so groß, daß im Lineweaver-Burk Diagramm annähernd das Bild einer unkompetitiven Hemmung vorliegt.

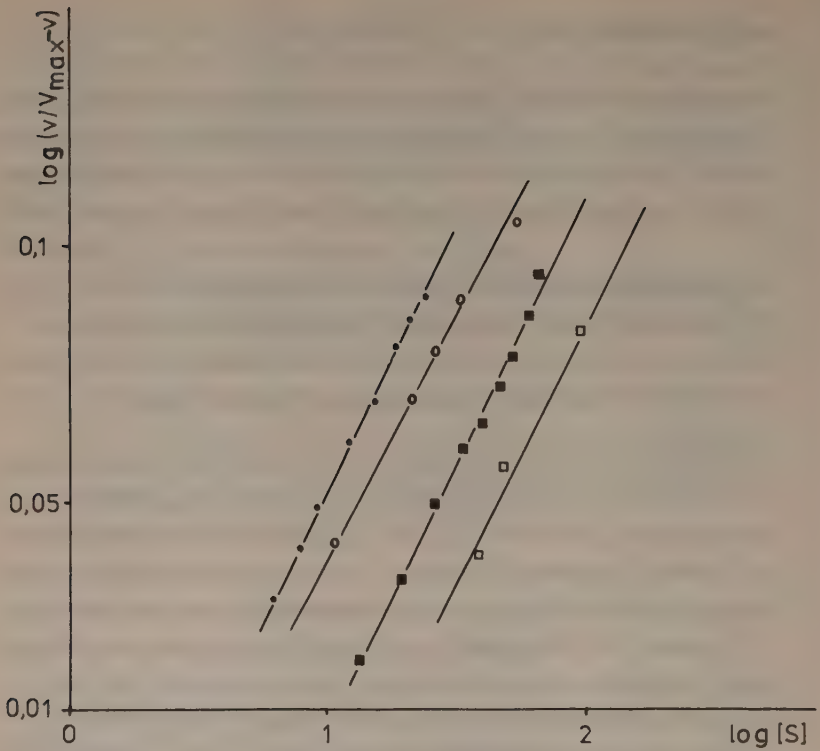


Abbildung 16

Hill-Darstellung für

- — • Dansylpenicillin $m = 1,11$
- ◊ — ◊ Propicillin $m = 1,05$
- — ■ Ampicillin $m = 1,11$
- — □ Pheniticillin $m = 1,11$

Aufgetragen sind $\log \frac{v}{V_{\max} - v}$ gegen $\log S$. ($[\mu \text{Mol}]$)

Die Steigung m wurde bestimmt nach $m = \frac{(y_2 - y_1) \cdot 5}{(x_2 - x_1) \cdot 9}$

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Cloxacillin in den verwendeten Konzentrationen höchstens zu einem nicht nachweisbaren Teil an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden wird. Eine meßbare Affinität zum aktiven Zentrum müßte zu dem Bild einer kompetitiven Hemmung bzw. zu einer gemischten Hemmung (kompetitiv, nicht kompetitiv) führen. Die Affinität von Cloxacillin zur nicht katalytischen Bindungsstelle hingegen ist aus den Ergebnissen ableitbar, wobei der durch die Bindung bewirkte Effekt sich nicht auf die Affinität des Enzyms zu penicillinase-empfindlichen Penicillinen, sondern auf die katalytische Aktivität auswirkt, d. h. K_m bleibt gleich, V_{max} wird kleiner (rein nicht-kompetitiv).

Wird wie bei Dicloxacillin und Flucloxacillin ein weiteres Halogenatom an den Ring gebunden, so resultiert daraus, wie Hemmungsuntersuchungen mit diesen Substraten als Inhibitor und Penicillin G Natrium als Substrat zeigen, ein stärkerer Einfluß des Inhibitors auf die Affinität des aktiven Zentrums von Substrat, was im Lineweaver-Burk Diagramm als Mischtyp zwischen unkompetitiver und nicht-kompetitiver Hemmung dokumentiert wird.

Bedeutung der Hemmungstypen für die Kombination verschiedener Penicilline in der klinischen Anwendung

Wie oben beschrieben, haben die chlorierten Isoxazolympenicilline eine größere Affinität zur nicht katalytischen Bindungsstelle des Enzyms und beeinflussen von hier die Aktivität des katalytischen Zentrums.

In der Therapie von Infektionskrankheiten werden heute auch Penicillinkombinationspräparate aus einem penicillinase-empfindlichen Penicillin und einem penicillinase-festen Penicillin verwendet, wobei man unter anderem davon ausgeht, daß

1. durch die unterschiedliche antibakterielle Wirkung der einzelnen Bestandteile des Kombinationspräparates eine Erweiterung des antibakteriellen Spektrums auftritt und
2. ein Hemmeffekt durch das penicillinase-feste Penicillin auf die enzymatische Hydrolyse des empfindlichen Penicillins ausgeübt wird.

Es müßte nun untersucht werden, ob nicht Substanzen, die eine ähnliche Struktur aufweisen wie die Seitenkette der chlorierten Isoxazolylpenicilline, bereits über eine Bindung an das nicht katalytisch aktive Zentrum eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität des Enzyms bewirken. Bei einem positiven Ausfall der Untersuchungen brauchte der Inhibitor bei den Kombinationspräparaten nicht unbedingt ebenfalls eine Penicillinstruktur aufzuweisen.

V. Darstellung, Charakterisierung und antibakterielle Wirksamkeit von Dansylpenicillin

Dansylchlorid wurde erstmals von Weber (92) zur Bildung eines fluoreszierenden Albuminkonjugats benutzt. Später wurden Methoden beschrieben (93), bei der Dansylchlorid zur Bestimmung endständiger Aminosäuren dient. Bei Reaktionen der Aminogruppe mit dem Sulfonsäurechlorid entsteht ein fluoreszierendes Produkt, das mit fluorimetrischen Verfahren gut nachweisbar ist. Dansylchlorid ist allerdings ein recht unspezifisches Reagenz, das mit einer großen Anzahl von Aminen reagiert. 6-Aminopenicillansäure sollte analog reagieren und ein fluoreszierendes Penicillin bzw. Sulfonamid ergeben.

Bei der Synthese bestand die Schwierigkeit darin, daß Dansylchlorid in organischen Lösungsmitteln gut löslich ist, während sich 6-Aminopenicillansäure nur in wäßrigem Milieu löst. Hinzu kommt, daß Dansylchlorid in Gegenwart von Wasser zur Dansylsulfonsäure hydrolysiert. Die Hydrolyserate nimmt mit steigendem pH zu. Allerdings muß der pH der Reaktionslösung im alkalischen Bereich liegen, da die Aminogruppe der 6-Aminopenicillansäure einen pK von etwa 6 hat, d. h. erst ab pH 8 weitgehend die reaktive nicht protonierte Form vorliegt.

Für die Endgruppenbestimmung der Aminosäuren hat es sich bewährt, die Reaktion mit 100-fachen Überschuß an Dansylchlorid bei einem pH zwischen 9,5 und 10,5 ablaufen zu lassen (94). Wegen der geringen Löslichkeit von Dansylchlorid in Aceton (etwa 50 g/l) und der durch Zugabe von Aceton bedingten pH Verschiebung in alkalische Bereiche

(Hydrolyse des β -Lactamrings!) wurde ein Mischungsverhältnis von 10 Volumen Puffer und 9 Volumen Aceton benutzt, das eine pH Erhöhung um etwa eine Einheit ergab.

Der Reaktionsansatz mußte außerdem gekühlt werden, um eine Hydrolyse des β -Lactamrings so niedrig wie möglich zu halten.

Eine Steigerung der Ausbeute wäre durch Einsatz von Katalysatoren denkbar. Nach 1. c (93) sollen tertiäre Stickstoffbasen die Reaktion von Dansylchlorid mit Aminogruppen katalysieren; Versuche mit Trimethylamin brachten jedoch keine Steigerung der Ausbeute. Das Natriumsalz des Reaktionsproduktes kann analog der Vorschrift durch Ersatz von KOH durch NaOH erhalten werden; allerdings ist die Kristallisation des Natriumsalzes unter den beschriebenen Bedingungen schlecht.

Die Dünnschichtchromatographie als Methode der Kontrolle des Reaktionsablaufs bot sich an, da es sich bei den Substanzen fast ausschließlich um fluoreszierende Stoffe handelte, die mit dem Fluotestgerät (Hanau) leicht zu detektieren waren. 6-Aminopenicillansäure konnte durch Besprühen der Platte mit Ninhydrin sichtbar gemacht werden. Dansylchlorid, Dansylsäure und Dansylamid sind Substanzen, die auch bei der Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden auftreten (93) und von daher in verschiedenen Chromatographiesystemen bereits untersucht waren (93). Bei Anregung mit $\lambda_{\text{excit}} = 360 \text{ nm}$ erscheint Dansylchlorid leuchtend dunkelblau, Dansylsulfonsäure hellblau (Maximum bei $\lambda = 460 \text{ nm}$), Dansylamid gelb-grün. Eine Unterscheidung zwischen Dansylamid und ebenfalls gelb-fluoreszierenden Reaktionsprodukten Dansylpenicillin und Dansylpenicillosäure konnte erst durch Referenzaufragungen gemacht werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß während des Reaktionsablaufs unter den gewählten Bedingungen Dansylamid nicht auftrat. Eine Differenzierung zwischen Dansylpenicillin und Dansylpenicillosäure war auf der Dünnschichtplatte anhand der Fluoreszenzfarbe nicht möglich, obwohl die Fluoreszenz von der Polarität der Substanz abhängt. Nicht polare dansylierte Aminosäuren zeigen eine Verschiebung mehr zum grün-gelben (Maximum bei $\lambda = 520 \text{ nm}$), während polare Aminosäuren eine orangefarbene

Fluoreszenz aufweisen (33). Die Trennung von Dansylpenicillin und Dansylpenicillosäure war jedoch aufgrund der unterschiedlichen Polarität und des damit verbundenen unterschiedlichen chromatographischen Verhaltens möglich.

Bei den von verschiedenen Autoren durchgeführten Untersuchungen der Fluoreszenzspektren unterschiedlicher Dansylderivate stellte sich heraus, daß

1. das Fluoreszenzspektrum abhängt von der Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels,
2. die Frequenz des emittierten Lichts abhängt von der Konfiguration des Moleküls und
3. mit abnehmendem pH eine Abnahme der Intensität der Fluoreszenz auftrat und bei Vorliegen der protonierten Form das Fluoreszenzspektrum dem des Naphthalins ähnelte (94).

Die während der Synthese von Dansylpenicillin gemachten Beobachtungen wurden durch die Fluoreszenzspektren erhärtet. Die Löschung der Fluoreszenz beim Ansäuern des Reaktionsgemisches auf pH 3 ist durch die in Abbildung 12 gezeigte Abhängigkeit der Intensität vom pH erklärt. Frische Lösungen von Dansylpenicillin in schwach alkalischem Milieu fluoreszieren gelb-grün, nach Aufbewahren bei Raumtemperatur für eine Woche jedoch orange. Diese Fluoreszenzverschiebung wurde auf die Hydrolyse des β -Lactamrings und der damit verbundenen pH-Verschiebung bezogen. Diese Beobachtungen konnten auch nach enzymatischer Hydrolyse gemacht werden.

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, zeigen die Kurven für Dansylpenicillin und des enzymatischen Spaltprodukts für jeden pH-Wert deutliche Unterschiede in der Wellenlänge des Emissionsmaximums, wobei sich mit sinkendem pH das Maximum zur langwelligeren Seite verschiebt. Betrachtet man die beiden Kurven für pH 8, so hat das Spektrum für Dansylpenicillin sein Maximum bei $\lambda = 531 \text{ nm}$, während das Maximum für Dansylpenicillosäure bei $\lambda = 543 \text{ nm}$ liegt. 530 nm läßt sich dem Frequenzbereich des gelben Lichts zuordnen, während $\lambda = 543 \text{ nm}$ mehr der Frequenz des orangenen Lichts entspricht.

D) Zusammenfassung

- 1) Es wird eine Gehaltsbestimmung verschiedener Penicilline durch photometrische Titration durchgeführt, wobei die Hydrolyse entweder enzymatisch (Penicillinase) oder durch Hydroxylionen (alkalisch) erfolgt.
- 2) Auf Grund der Ergebnisse der photometrischen Titration nach enzymatischer oder alkalischer Hydrolyse wird eine Klassifizierung in penicillinase-empfindliche, penicillinase-resistente und penicillinase-feste Penicilline durchgeführt.
- 3) Die molaren Extinktionskoeffizienten der gebildeten Mercaptide für die untersuchten Penicilline werden bestimmt und verglichen.
- 4) Es werden Aktivitätsbestimmungen der Penicillinase Riker durchgeführt, wobei als Substrate die penicillinase-empfindlichen und penicillinase-resistenten Penicilline eingesetzt werden.
- 5) Anhand der extrapolierten Werte für die maximale Umsatzgeschwindigkeit ($V_{\max}$) wird eine Aussage über die Empfindlichkeit der einzelnen Penicilline gegenüber Penicillinase Riker gemacht.
- 6) Es wird für einzelne Penicilline eine Substratüberschußhemmung in unterschiedlichen, für jedes Substrat einzeln bestimmten Konzentrationsbereichen nachgewiesen und auf Grund dieser Ergebnisse auf mindestens eine weitere, nicht katalytisch aktive Bindungsstelle an der Penicillinase geschlossen.
- 7) Es wird untersucht, ob Nafcillin, ein Präparat der penicillinase-resistenten Gruppe, einen hemmenden Einfluß auf die enzymatische Hydrolyse von Pheneticillin, einem Substrat der penicillinase-empfindlichen Gruppe, ausübt. Hierbei wird eine Hemmung vom kompetitiven Typ festgestellt.
- 8) Es wird untersucht, welchen Einfluß Substrate der penicillinase-festen Penicilline auf die enzymatische Hydrolyse von Penicillinen der penicillinase-empfindlichen Gruppe ausüben. Dabei wird ein nicht-kompetitiver Hemmungstyp ermittelt.
- 9) Es wird eine Erklärung der unterschiedlichen Hemmungstypen mit der "Mehr-Bindungsstellen-Hypothese" versucht.

- 10) Dansylpenicillin wird aus 6-Aminopenicillansäure und Dansylchlorid synthetisiert.
- 11) Das Syntheseprodukt wird charakterisiert und auf seine antimikrobielle Wirksamkeit untersucht.

E) Material und Methoden

I. Material

1. Geräte

a) Spektrometrie

Zur Durchführung der Extinktionsmessungen wurde das Spektralphotometer OMQ II der Firma Zeiss benutzt. Die Absorptionsspektren von Dansylpenicillin und des dazugehörigen Hydrolyseprodukts wurden mit dem Spektralphotometer Acta V der Firma Beckman geschrieben.

Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem Spektralfluorimeter mit zwei Monochromatoren M4Q III der Firma Zeiss aufgenommen.

Das Infrarotspektrum wurde mit dem Infrarotspektralphotometer IR 7 der Firma Beckman geschrieben.

Zur qualitativen Fluoreszenzkontrolle wurde das Fluotestgerät Fluotest Universal der Firma Hanau Quarzlampen GmbH benutzt.

b) Chromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 der Firma Merck. Format: 20 x 20 cm und 5 x 20 cm, Beschichtungsdicke 0,2 mm und Format 20 x 20 cm, Beschichtungsdicke 2 mm.

c) Lyophilisation

Zur Gefriertrocknung wurde der Lyophilisator GT 1,5 der Firma Leybold, Köln-Bayental, benutzt.

d) Rechenverfahren

Die Bestimmung der Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizienten erfolgte mit dem elektronischen Rechensystem Diehl combitron S mit Diehl dilector (Programm: Diehl Archiv Nr. 10343a)

2. Präparate

Die für die Untersuchungen eingesetzten Penicilline waren Präparate, die auch zur Chemotherapie verwendet werden. Die mir freundlicherweise von den Herstellern zur Verfügung gestellten Präparate sind in Tabelle 15 aufgeführt.

6-Aminopenicillansäure wurde mir freundlicherweise von den Firmen Bayer Leverkusen und Beecham Pharma GmbH überlassen.

Penicillinase (Neutrapen) war ein Präparat der Firma Riker, Northridge California. Das Begleitblatt wies aus, daß die lyophilisierte Penicillinase aus *Bacillus cereus* Kulturen gewonnen und mit einem Zusatz NaCl versetzt war. Eine Ampulle enthielt 800.000 Einheiten nach Levy (95), das sind umgerechnet 1340 international Units.^{x)}

Dansylpenicillin wurde nach dem auf S. 79 beschriebenen Verfahren hergestellt.

3. Reagenzien

Dimethylaminonaphthalinsulfonsäurechlorid (Dansylchlorid) und p-Chlormercuribenzoessäure - Natriumsalz (pCMB) waren Präparate der Firma Serva, Heidelberg.

Dansylamid war ein nach dem Verfahren von Weber (92) hergestelltes Laborpräparat.

Die übrigen Substanzen waren analysenreine Handelspräparate der E. Merck AG, Darmstadt.

x) 1 Einheit nach Levy = die Menge Penicillinase, die bei 25⁰ C und pH 7 1 Einheit Penicillin pro Minute inaktiviert.

1 international Unit (IU) = Enzymmenge, die bei 25⁰ C und pH Optimum 1 µMol Substrat pro Minute umsetzt.

4. Lösungen

Penicillinaselösung:

Nach den Angaben des Herstellers wurde der Inhalt einer Ampulle Neutrapin in 2 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Die weitere Verdünnung dieser Enzymlösung erfolgte mit 0,1 M Phosphatpuffer und ist bei den entsprechenden Versuchen aufgeführt.

0,5 mM Cysteinlösung zur Ermittlung des Titors der pCMB-Lösung:

8,8 mg Cystein wurden auf 0,01 mg genau abgewogen und mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml im Meßkolben aufgefüllt. In das hierzu verwendete bidestillierte Wasser wurde zuvor gereinigter Stickstoff geleitet, um das Wasser von gelöstem Sauerstoff zu befreien. Dies war notwendig, um die Oxidation der SH Gruppen durch Luftintritt auszuschließen.

25 μ M pCMB-Lösung (96):

Zur Herstellung einer 1 mM Stammlösung wird die entsprechende Menge pCMB in 1 mM NaOH gelöst. Am Versuchstag wurden dann 5 ml dieser Stammlösung mit 0,33 M Acetatpuffer pH 4,6 oder mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 auf 200 ml aufgefüllt. Der Titer wurde vor Gebrauch mit Cysteinlösung ermittelt.

Pufferlösungen:

0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 (nach Sörensen):

1 Volumen 0,1 M KH_2PO_4 -Lösung (13,608 g KH_2PO_4 ad 1 l bidestilliertem Wasser) wurde mit 1 Volumen 0,1 M Na_2HPO_4 -Lösung (17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 1 l bidestilliertem Wasser) gemischt. Die genaue Einstellung des pH Wertes erfolgte mittels Glaselektrode durch Zugabe der entsprechenden Stammlösung (97).

0,33 M Acetatpuffer pH 4,6 wurde hergestellt, indem 2 Volumen 0,5 N Essigsäure mit 1 Volumen 0,5 N NaOH gemischt wurden. Die genaue Einstellung erfolgte auch hier durch Zusatz der entsprechenden Stammlösung (97).

Der Phosphatpuffer pH 7, 8 für die Synthese von Dansylpenicillin wurde durch Mischung von 50 Volumen 0,1 M KH_2PO_4 mit 44,5 Volumen 0,1 M NaOH hergestellt (98).

0,2 N Acetatpuffer pH 4 (97):

Zu 18 ml einer 1 N NaOH Lösung wurden 100 ml 1 N Essigsäure hinzugegeben und in einem Meßkolben mit bidestilliertem H_2O auf 500 ml aufgefüllt.

0,2 N Acetatpuffer pH 5 (97):

Zu 70,5 ml einer 1 N NaOH Lösung wurden 100 ml 1 N Essigsäure hinzugegeben und im Meßkolben mit bidestilliertem H_2O auf 500 ml aufgefüllt.

Phosphatpuffer nach Sørensen von pH 6, pH 7, pH 8 wurden nach l. c. (97) hergestellt.

II. Methoden

1. Gehaltsbestimmung von Penicillinen (68)

a) durch photometrische Titration nach enzymatischer Hydrolyse:

In eine 4 cm Quarzküvette wurden 10 ml einer etwa 25 μM pCMB Lösung in 0,33 M Acetatpuffer pH 4,6 pipettiert und in 50 μl Schritten mit einer etwa 0,5 mM Cysteinlösung bekannten Titors titriert. Die Extinktionszunahme wurde bei 250 nm verfolgt und der Äquivalenzpunkt graphisch ermittelt. Aus dem verbrauchten Volumen und der Konzentration der Cysteinlösung wurde die vorgelegte Menge pCMB berechnet. Etwa 50 μMol Penicillin wurden auf 0,01 mg genau eingewogen und mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 im Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt. 250 μl dieser Penicillinlösung wurden in eine 4 cm Quarzküvette zu 10 ml einer 25 μM pCMB Lösung in 0,33 M Acetatpuffer pH 4,6 pipettiert. Nach Kontrolle der Extinktion wurden 20 μl Penicillinlösung zugegeben.

Das Ende der enzymatischen Reaktion wurde abgewartet und die nicht umgesetzte Menge pCMB durch Rücktitration mit Cystein wie oben beschrieben bestimmt. Doppelbestimmungen ergaben die in Tabelle 1a-c aufgeführten Mittelwerte.

Rechengang am Beispiel von Penicillin V K:

Einwaage	19,378 mg	49,88 μ Mol
davon eingesetzt 1/400		124,7 nMol
Molarität der Cysteinlösung 8,811 mg/100 ml	=	0,502 mM
Verbrauch bei Titration 1 : 475 μ l	=	238,45 nMol
Verbrauch bei Titration 2 : 232,5 μ l	=	116,71 nMol
gefundene Menge Penicillin V K		121,74 nMol
	entspricht	97,6 %.

- b) durch photometrische Titration nach alkalischer Hydrolyse (68):
 Etwa 50 μ Mol Penicillin wurden genau eingewogen und in einem 100 ml Meßkolben mit 16,5 ml 1 N NaOH versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden 33 ml 1 N Essigsäure zugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. 250 μ l der so erhaltenen etwa 0,5 mM Lösung des Hydrolyseprodukts in 0,33 M Acetatpuffer pH 4,6 wurde nach den unter 1a beschriebenen Verfahren zur Bestimmung eingesetzt.

2. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten

100 ml einer 1 mM Lösung von Penicillin wurde durch entsprechende Einwaage und Lösen in bidestilliertem Wasser hergestellt. Es wurden folgende Verdünnungsstufen angefertigt: 1 : 10, 1,5 : 10, 2 : 10, 2,5 : 10, 3 : 10, 3,5 : 10, 4 : 10, 5 : 10, 6 : 10, 7 : 10, 8 : 10, 9 : 10, 10 : 10. Von jeder Verdünnung wurden 250 μ l in eine Quarzküvette zu 10 ml 25 μ M pCMB Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 pipettiert, 20 μ l Enzymlösung zugegeben und nach Beendigung der Hydrolyse, erkennbar an der Konstanz der Extinktion, die Extinktion abgelesen und in einem Diagramm gegen die Konzentrationen Penicillosäure aufgetragen (Abb. 2).

Alle Messungen erfolgten gegen 10 ml pCMB Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6, 8. Aus den Werten, die noch nicht von einer Geraden abwichen, wurde die Regressionsgerade berechnet (Tab. 3).

Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden nach der Gleichung $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ als Steigung der Regressionsgeraden dividiert durch die Schichtdicke $d = 4$ cm berechnet (Tab. 3).

3. Photometrische Bestimmung der kinetischen Parameter von Penicillinase Riker für unterschiedliche Substrate

a) photometrische Bestimmung der Penicillinaseaktivität:

Als Meßstrahlung für die Absorptionsmessungen diente die Wellenlänge von 250 nm.

Der Reaktionsansatz enthielt in der 4 cm Quarzküvette 10 ml 25 μ M pCMB in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6, 8, hinzu wurde 20 μ l Penicillinlösung von der Verdünnung pipettiert, die ein Verfolgen der Reaktionsgeschwindigkeit ermöglichte. Da die Reaktionsgeschwindigkeit auch von der Art des Substrats abhängt, mußte für die einzelnen Substrate in Vorversuchen die günstigste Enzymverdünnung bestimmt werden (Tab. 6 u. 7).

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l einer Penicillinlösung bekannter Molarität. Zur Bestimmung der Michaeliskonstanten wurde von der Penicillinausgangslösung verschiedene Verdünnungen mit der Bürette hergestellt und die jeweilige Verdünnung zum Start der Reaktion eingesetzt.

Im Vergleichsansatz befanden sich 10 ml 25 μ M pCMB in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6, 8, 20 μ l Enzymlösung gleicher Verdünnung wie im Reaktionsansatz sowie 100 μ l Phosphatpuffer anstelle der Penicillinverdünnung. Die Extinktion wurde alle 15 Sekunden abgelesen und die Aktivität des Enzyms in $\Delta E/\text{min}$ für die einzelnen Substratverdünnungen graphisch ermittelt. Die Werte wurden in ein Diagramm nach Lineweaver-Burk ($1/v - 1/[S]$) übertragen und $1/K_m$ graphisch ermittelt.

Bei den Messungen der Substratüberschußhemmung wurde in gleicher Weise vorgegangen, nur wurde der Konzentrationsbereich, in dem die Umsatzgeschwindigkeiten bestimmt wurden, nach oben hin erweitert.

- b) photometrische Bestimmung der Hemmung von Penicillinase durch Zusatz von penicillinase-festen bzw. penicillinase-resistenten Penicillinen:

Der Reaktionsansatz enthielt 10 ml 0,25 μ M pCMB Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8, 20 μ l Penicillinase Riker in für den Versuch geeigneter Verdünnung, 100 μ l penicillinase-resistentes oder penicillinase-festes Substrat. Es wurde die Extinktion abgelesen, und bei Konstanz der Extinktion über etwa 2 Min. wurde die Reaktion mit 100 μ l penicillinase-empfindlichem Substrat gestartet. Gemessen wurde bei einer Meßstrahlung von $\lambda = 250$ nm gegen einen Vergleichsansatz mit gleichem Inhalt wie der Reaktionsansatz, nur war hier das umsetzbare Substrat durch ein äquivalentes Volumen an Puffer ersetzt. Von den penicillinase-empfindlichen Substraten wurden verschiedene Verdünnungen mit der Bürette hergestellt und die Enzymaktivität bestimmt. Verschiedene Hemmkonzentrationen wurden durch Herstellen der verschiedenen Puffer - Hemmsubstratgemische angesetzt. Die ungehemmte Aktivität wurde analog der unter III 1 beschriebenen Anordnung bestimmt, nur wurden anstelle der 100 μ l Hemmstofflösung 100 μ l Puffer sowohl in den Reaktionsansatz als auch in den Vergleichsansatz pipettiert.

4. Darstellung von Dansylpenicillin

4,7 g 6-Aminopenicillansäure wurden in 1 l 1/15 Mol/l Phosphatpuffer pH 7,8 gelöst und auf 15⁰ C abgekühlt. Dazu wurden 400 ml auf 15⁰ C temperiertes Aceton gegeben und im Eisbad gerührt. 2,5 g Dansylchlorid wurden in 500 ml Aceton gelöst und filtriert. Die Dansylchloridlösung (Raumtemperatur) wurde tropfenweise über 30 Min. zur 6-Aminopenicillansäurelösung gegeben, wobei eine Temperatur von 15⁰ C nicht

überschritten wurde. Nach 40 Min. Rühren wurde zur Entfernung nicht umgesetzten Dansylchlorids zweimal mit je 200 ml kaltem Chloroform ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase (pH 7,2) wurde mit H_3PO_4 (80 % H_3PO_4 mit H_2O 1 : 2 verdünnt) bis pH 2,6 angesäuert und anschließend mit 50 ml Äther ausgeschüttelt. 6-Aminopenicillansäure und Dansylsäure blieben in der wäßrigen Phase; das Reaktionsprodukt befindet sich in der organischen Phase. Die Ätherphase wurde mit 10 ml H_2O versetzt und unter starkem Rühren mit 0,1 N KOH auf pH 7 titriert. Nach Verwerfen der Ätherphase wird die wäßrige Phase, die das Kaliumsalz des Reaktionsprodukts enthält, lyophilisiert. Das stark gelb-grün fluoreszierende Lyophilisat (1,0181 g) wurde in 20 ml n-Butanol angelöst und tropfenweise mit 0,5 ml H_2O versetzt, worauf starker, hellblau fluoreszierender körniger Niederschlag auftrat (Rohprodukt). Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 5 ml H_2O gelöst und mit 50 ml n-Butanol versetzt, worauf eine geringe Trübung auftrat. Nach 5 Stunden bei 4^0C wurde das Kristallisat in einer Fritte G 4 abgesaugt und 20 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Ausbeute war 632,2 mg hellblau fluoreszierende kristalline Substanz. Erneute Umkristallisation durch Lösen in wassergesättigtem n-Butanol bei Raumtemperatur und Stehenlassen für 24 Stunden bei 4^0C ergab eine Kristallisation, die mit 10 ml mit Na_2SO_4 getrocknetem n-Butanol nachgewaschen und anschließend im Exsikkator über P_2O_5 bei Raumtemperatur 20 Stunden getrocknet wurde.

Ausbeute: 257,6 mg lockeres Kristallisat.

Die dekantierten Butanolphasen wurden gesammelt und ergaben nach 6 Tagen bei 4^0C eine weitere Kristallisation von 60 mg Reaktionsprodukt.

Die Elementaranalyse für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_3\text{S}_2\text{K} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ergab

berechnet C 45,87 %	H 5,00 %	N 8,02 %	S 12,24 %
gefunden C 45,80 %	H 4,97 %	N 8,02 %	S 11,60 %

5. Absorptionsspektren zwischen 360 und 210 nm bei verschiedenen pH Werten

a) Absorptionsspektrum von Dansylpenicillin

10 ml Puffer eines definierten pH zwischen 4 und 8 wurden in eine 4 cm Quarzküvette gegeben und nach Zugabe von 100 μ l 0,5 mM Dansylpenicillin das Spektrum zwischen 360 und 210 nm gegen einen Vergleichsansatz von 10,1 ml Pufferlösung geschrieben (Abb. 11). Zur Registrierung wurde das Spektralphotometer Acta V von Beckman benutzt.

b) Absorptionsspektrum von Dansylpenicillin und Dansylpenicillosäure

Zu 10 ml Puffer eines definierten pH Wertes zwischen 4 und 9 wurden 100 μ l einer 0,5 mM Dansylpenicillinlösung gegeben und das Spektrum zwischen 360 und 210 nm gegen 10,1 ml Puffer geschrieben. Anschließend wurden 20 μ l Penicillinase-Lösung in den Reaktions- und Vergleichsansatz gegeben und nach 15 Min. wiederum das Spektrum zwischen 360 und 210 nm geschrieben (Dansylpenicillosäure, vergl. Abb. 12).

6. Fluoreszenzspektren von Dansylpenicillin bei $\lambda_{\text{excit}} = 362,5 \text{ nm}$ zwischen 700 und 300 nm

In eine 1 cm Quarzküvette wurden 3 ml Puffer eines bestimmten pH gegeben und nach Zugabe von 100 μ l einer 0,5 mM Dansylpenicillinlösung das Fluoreszenzspektrum bei einer Excitationsfrequenz von 362,5 nm gemessen. Nach Zusatz von 20 μ l Enzym und Abwarten des Reaktionsendes konnte das Spektrum von Dansylpenicillosäure aufgenommen werden (Abb. 13).

7. Infrarotspektrum (Abb. 14)

Zur Aufnahme des Infrarotspektrums wurde das Infrarotspektralphotometer IR 7 benutzt. 150 mg wasserfreies KBr wurde im Mörser zerstossen und mit 1,5 mg Dansylpenicillin gemischt. In einer Vakuumpresse wurde aus diesem Gemisch ein Preßling hergestellt, der in den

Meßstrahl des Infrarotspektrometers gebracht wurde. Gemessen wurde gegen einen in analoger Weise angefertigten KBr-Preßling ohne Dansylpenicillin im Referenzstrahl.

8. Antibakterielle Prüfung

Die Untersuchung der Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* wurde wie folgt durchgeführt:

Eine Petrischale wurde mit einfachem Agar, bestehend aus 2 % Agar normal, 0,5 % NaCl und 1 % Pepton, in den *Bacillus subtilis* Keime gemischt waren, ausgegossen. Runde Plättchen von 4 mm Durchmesser wurden mit den aus Tabelle 12 zu entnehmenden Substanzen getränkt, wobei etwa äquimolare Mengen verwendet wurden. Diese Plättchen wurden auf den Agar aufgelegt. Die so vorbereiteten Petrischalen wurden etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 38⁰ C wurde der Durchmesser des Hemmhofs bestimmt.

Zur Bestimmung des antimikrobiellen Spektrums wurde ein Blutagar verwandt, der im Gegensatz zu dem oben beschriebenen einfachen Agar einen Zusatz von 5 - 7 % Hammelblut enthielt. In den Agar wurden Löcher von etwa 3 mm Durchmesser gestanzt, in die in Phosphatpuffer gelöstes Dansylpenicillin pipettiert wurde. Als Referenzsubstanz wurden Penicillin G Testplättchen auf den Agar gebracht. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Platten 24 Stunden bei 38⁰ C bebrütet und anschließend die Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt. Die Keime stammten aus dem Untersuchungsmaterial des Klinikum Steglitz; sie wurden mit einer Platinöse aus dem angereicherten Untersuchungsmaterial auf die Platten überimpft.

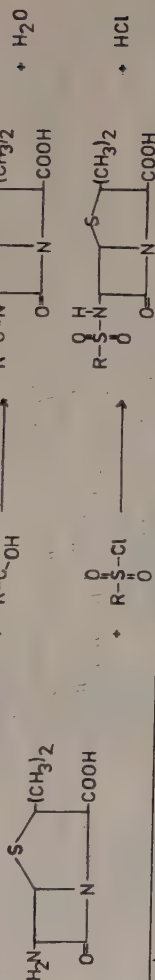
9. Systematik der verwendeten Penicilline ; Tabelle 15

a) Aufbau: Grundbaustein 6-Aminopenicillansäure

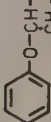
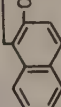
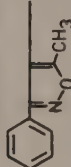
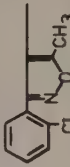
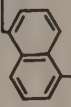
Substitution der Aminogruppe mit: 1. Carbonsäuren

2. 5-Dimethylaminonaphthalinsulfonsäurechlorid

Allgemeines Reaktionsschema:



Generic Name INN	Systematische Bezeichnung	Warenzeichen Hersteller	Formel des Substituenten R	Summenformel	Molekular- gewicht
Penicillin G Na	Phenylacetamido-penicillansäure Natrium Salz	Hoechst		$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$	356, 38
Penicillinum V K	Phenoxyacetamido - penicillansäure Kalium Salz	Isocillin Hoechst		$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$	388, 49
Ampicillinum	D - (-) - α - Aminophenyl - acetamidopenicillansäure - Trihydrat - Natrium Salz	Penbrock Beecham Amblosin Hoechst		$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_3\text{S}$ $3 \text{ H}_2\text{O}$	348, 40 371, 39
Carbenicillinum	D - (-) - α - Carboxyphenyl - acetamidopenicillansäure - Dinatrium Salz	Penbritin Beecham Microcillin Bayer		$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$ Na_2	422, 37
Pheneticillinum	α -Phenoxypropionamido - penicillansäure - Kalium Salz	Oralopen Bayer		$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$ K	402, 52

Generic Name INN	Systematische Bezeichnung	Warenzeichen Hersteller	Formel des Substituenten R	Summenformel	Molekulargewicht
Propicillinum	α - Phenoxybutyramido - penicillansäure - Kalium Salz	Propicillin Bayer		$C_{18}H_{21}O_5N_2S$ K	416, 54
Nafcillinum	2- Äthoxy - 1-naphthamido - penicillansäure - Natrium Salz Monohydrat	Unipen Wyeth		$C_{21}H_{21}O_5N_2S$ Na · H ₂ O	454, 48
Oxacillinum	3 - Phenyl - 5 - methyl - isoxazol - 4 - carboxamido - penicillansäure Na Monohydrat	Cryptocillin Hoechst		$C_{19}H_{18}O_5N_3S$ Na · H ₂ O	441, 44
Cloxacillinum	3 - o - Chlorphenyl - 5 methyl - isoxazol - 4 - carboxamido - penicillansäure Monohydrat	Orbenin Beecham		$C_{19}H_{17}O_5N_3S$ Na · H ₂ O	475, 88
Di-cloxacillinum	3 - (2, 6 Dichlorphenyl) - 5 methylisoxazol - 4 carbox - amidopenicillansäure Na Salz	Dichlor Stapenor Beecham		$C_{19}H_{16}O_5N_3S$ Na	510, 33
Flu - cloxacillinum	3 - (2 Fluor, 6 Chlor phenyl) - 5 methylisoxazol - 4 carboxamidopenicillansäure Kalium Salz	Beecham		$C_{19}H_{16}O_5N_3S$ F Na	476, 87
—	6 - (5 - Dimethylamino - naphthalin sulfonamido - penicillansäure Kalium Salz Dihydrat	eigene Herstellung		$C_{20}H_{22}O_5N_3S_2$ K · 2 H ₂ O	523, 68

$$= \frac{K_m}{V_{\max}} - \frac{1}{V_{\max} \cdot K_{ESS'}} \cdot [S_{\text{opt}}]^2$$

$$\frac{[S_{\text{opt}}]^2}{K_{ESS'} \cdot V_{\max}} = \frac{K_m}{V_{\max}}$$

$$\frac{[S_{\text{opt}}]}{K_{ESS'}} = \frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]}$$

Gleichung 5.1

$$[S_{\text{opt}}]^2 = K_m \cdot K_{ESS'}$$

Gleichung 5

$$[S_{\text{opt}}] = \sqrt{K_m \cdot K_{ESS'}}$$

III. Ermittlung von $V_{\max}$ und K_m

Die Umformung von Gleichung 2 ergibt:

$$v = V_{\max} \cdot \frac{1}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{1}{K_{ESS'}}}$$

Gleichung 6

Die optimale Geschwindigkeit v_{opt} ergibt sich, wenn $[S_{\text{opt}}]$ in die allgemeine Geschwindigkeitsgleichung (Gl. 6) für die Substratüberschußhemmung eingesetzt wird.

$$v_{\text{opt}} = V_{\max} \cdot \frac{1}{\frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]} + 1 + \frac{1}{K_{ESS'}}}$$

Gleichung 6.1

Umformung ergibt

$$V_{\max} = v_{\text{opt}} \cdot \left(1 + 2 \frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]} \right)$$

Gleichung 4

$V_{\max}$ und K_m sind die gesuchten unbekannten Größen. V_{opt} und $[S_{\text{opt}}]$ ergeben sich aus einem Diagramm, in dem v gegen $p[S]$ aufgetragen wird. Zur Eliminierung einer der beiden Unbekannten aus Gleichung 4 sind folgende Bedingungen aufzustellen:

$$v_{\text{opt}} = V_{\max} \cdot \frac{1}{\frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]} + 1 + \frac{[S_{\text{opt}}]}{K_{\text{ESS}}}} \quad \text{Gleichung 6.1}$$

$$\frac{v_{\text{opt}}}{2} = V_{\max} \cdot \frac{1}{\frac{K_m}{[S_{v_{\text{opt}}/2}]} + 1 + \frac{[S_{v_{\text{opt}}/2}]}{K_{\text{ESS}}}} \quad \text{Gleichung 6.2}$$

wobei $[S_{v_{\text{opt}}/2}]$ der Substratkonzentration bei halboptimaler Geschwindigkeit entspricht. Eine Division von Gleichung 6.2 durch Gleichung 6.1 ergibt:

$$2 = \frac{\frac{K_m}{[S_{v_{\text{opt}}/2}]} + 1 + \frac{[S_{v_{\text{opt}}/2}]}{K_{\text{ESS}}}}{\frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]} + 1 + \frac{[S_{\text{opt}}]}{K_{\text{ESS}}}}$$

Umformung über

$$2 \cdot \frac{K_m}{[S_{v_{\text{opt}}/2}]} + 1 + \frac{[S_{\text{opt}}]}{K_{\text{ESS}}} = \frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]} \cdot \frac{[S_{\text{opt}}]}{[S_{v_{\text{opt}}/2}]} + 1 + \frac{[S_{v_{\text{opt}}/2}]}{K_{\text{ESS}}}$$

und Erweiterung mit $\frac{[S_{\text{opt}}]}{[S_{\text{opt}}]}$

$$2 \cdot \frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]} + 2 + 2 \frac{[S_{\text{opt}}]}{K_{\text{ESS}}} - \frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]} \cdot \frac{[S_{\text{opt}}]}{[S_{v_{\text{opt}}/2}]} - \frac{[S_{\text{opt}}]}{K_{\text{ESS}}} \cdot \frac{[S_{v_{\text{opt}}/2}]}{[S_{\text{opt}}]} = 1$$

$$\frac{K_m}{[S_{\text{opt}}]} \cdot \left(2 - \frac{[S_{\text{opt}}]}{[S_{v_{\text{opt}}/2}]} \right) + \frac{[S_{\text{opt}}]}{K_{\text{ESS}}} \cdot \left(2 - \frac{[S_{v_{\text{opt}}/2}]}{[S_{\text{opt}}]} \right) = -1$$

Einsetzen von Gleichung 5.1 ergibt:

$$\frac{K_m}{[S_{opt}]} = \frac{1}{\frac{[S_{opt}]}{[S_{v_{opt}/2}]} + \frac{[S_{v_{opt}/2}]}{[S_{opt}]} - 4} \quad \boxed{\text{Gleichung 7}}$$

Einsetzen von Gleichung 7 in Gleichung 5 ergibt:

$$V_{max} = v_{opt} \cdot \frac{2}{\frac{[S_{opt}]}{[S_{v_{opt}/2}]} + \frac{[S_{v_{opt}/2}]}{[S_{opt}]} - 4} + 1 \quad \boxed{\text{Gleichung 8}}$$

Damit ist V_{max} aus bekannten Größen zu ermitteln. Durch Einsetzen des errechneten Wertes für V_{max} in Gleichung 4 errechnet sich der Wert für K_m .

11. Symbole

E	Enzym
S	Substrat
$[S_{\text{opt}}]$	Substratkonzentration, die die optimale Geschwindigkeit v_{opt} liefert
$[S_{v_{\text{opt}}/2}]$	Substratkonzentration bei halboptimaler Geschwindigkeit
P	Produkt
I	Inhibitor
P_I	Produkt aus der Reaktion des Enzyms mit dem als Substrat fungierenden Inhibitor
ES	Enzym - Substrat - Komplex, wobei das Substrat an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden ist
ES'	Enzym - Substrat - Komplex, wobei das Substrat an eine andere, nicht katalytisch aktive Stelle des Enzyms gebunden ist
ESS'	Enzym - Substrat - Komplex, wobei das aktive Zentrum und eine nicht katalytisch aktive Bindungsstelle von je einem Molekül Substrat besetzt ist
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}	Reaktionsgeschwindigkeit bei unendlich großer Substratkonzentration (extrapoliert)
v_{opt}	Reaktionsgeschwindigkeit bei tatsächlicher, optimaler Substratkonzentration
K_m	$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, Michaeliskonstante
$K_{\text{ESS}'}$	Dissoziationskonstante des ESS'-Komplexes $\frac{k_{-3}}{k_3}$
K_S, K_S, K_I, K_I	Substratbindungskonstanten
k_1, k_2, k_3, k_{-1}	Geschwindigkeitskonstanten
$K_{\text{ESI}'}$	Dissoziationskonstante des ESI'-Komplexes
$K_{\text{EIS}'}$	Dissoziationskonstante des EIS'-Komplexes

- α Ausschließungsfaktor, d.h. α ist der Faktor, um den
die Gleichgewichtskonstante der ESS'-Bildung kleiner
oder größer ist als die der ES'-Bildung
- pS = $-\log [S]$ (analog zu $pH = -\log [H^+]$)
- β, γ Ausschließungsfaktoren

F) Literaturverzeichnis

1. Weinstein, L. (1971) in "The Pharmacological Basis of Therapeutics" (Goodman, L.S. & Gilman, A., ed.) 4. ed. Chapter 55, pp 1154 - 1176, Macmillan Company, London. "Chemotherapy of Microbial Disease"
2. Sasykin, J. U. (1972) in "Antibiotika als Inhibitoren biochemischer Prozesse" (Westermann, P., ed.) pp 13 - 54, Akademie Verlag, Berlin
3. Gardner, A. D. (1940) Nature Lond. 146, 837. "Morphological Effects of Penicillin on Bacteria"
4. Dugnid, J. P. (1946) Edinburgh Med. J. 53, 401. "The Sensivity of Bacteria to the Action of Penicillin"
5. Park, J. T. & Johnson, M. J. (1949) J. Biol. Chem. 179, 585.
" Accumulation of Labile Phosphate in Staphylococcus Aureus Grown in the Presence of Penicillin"
6. Park, J. T. (1952) J. Biol. Chem. 194, 877, 885, 897. "Uridine - 5 - pyrophosphate Derivates"
I) "Isolation from Staphylococcus Aureus"
II) "A Structure Common to Three Derivates"
III) " Amino Acid containing Derivates"
7. Lederberg, J. (1956) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 42, 574.
"Bacterial Protoplasts Induced by Penicillin"
8. Maass, E. A. & Johnson, M. J. (1949) J. Bacteriol. 57, 415.
"Penicillin Uptake by Bacterial Cells"
9. Eagle, H. , Levy, M. & Fleischman, R. (1955) J. Bacteriol. 69, 167.
"The Binding of Penicillin in Relation to its Cytotoxic Action. IV. The Amounts Bound by Bacteria at Ineffective, Growth - Inhibitory, Bactericidal, and Maximally Effective Concentrations"

10. Eagle, H. (1954) J. Exp. Med. 99, 207. "The Binding of Penicillin in Relation to its Cytotoxic Action"
I." Correlation Between the Penicillin Sensitivity and Combining Activity of Intakt Bacteria and Cell-Free Extracts"
11. Cooper, P. D. (1954) J. Gen. Microbiol. 10, 236. "The Association of the Penicillin - Binding Component of Staphylococcus Aureus with a Lipid Fraction"
12. Mitchell, P. & Moyle, J. (1957) J. Gen. Microbiol. 16, 184,
"Autolytic Release and Osmotic Properties of Protoplasts from Staphylococcus Aureus"
13. Rauenbusch, E. (1968) Antibiotica. et Chemother. 14, 95.
"Penicillin Wirkung und Penicillin Resistenz"
14. Bigger, J. W. (1944) Irish J. Med. Sci. 6, 553. "The Bactericidal Action of Penicillin on Staphylococcus Pyogenes"
15. Bigger, J. W. (1944) Lancet II/497. "Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin by intermittent Sterilisation"
16. Klieneberger - Nobel, E. (1960) in "The Bacteria" (Gunsalus, I. C. & Stainer, R. Y., ed.) Vol. I, pp 361 - 386.
Acad. Press, New York/London.
"L - Forms of Bacteria"
17. Smith, J. T. & Hamilton - Miller, J. M. T. (1963) Nature, Lond. 197, 976. "Differences Between Penicillinases from Gram-positive and Gram-negative Bacteria"
18. Hamilton-Miller, J. M. T. (1965) J. Gen. Microbiol. 41, 175.
"Modes of Resistance to Benzylpenicillin and Ampicillin in Twelve Klebsiella Strains"
19. Abraham, E. P. & Chain, E. (1940) Nature 146, 837.
"An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin"
20. Benedict, R. G., Schmidt, W. H. & Coghill, R. D. (1945) Arch. Biochem. Biophys. 8, 377. "Penicillin, VII. Penicillinase"

21. Foster, J.W. (1945) Science 101, 205. "Acid Formation from Penicillin During Enzymatic Inactivation"
22. Abraham, E.P. (1951) in "The Enzymes" (Sumner, J.B. & Myrbäck, K., ed.) 1 ed., Vol. I, Chap. 37, pp 1170-1185 Acad. Press Inc., New York. "Penicillinase"
23. Bondi, A.J. & Dietz, C.C. (1944) Proc.Soc. Exp. Biol. 56, 135.
"Relationship of Penicillinase to the Action of Penicillin"
24. Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.H.C. & Rolinson, G.N. (1959) Nature 183, 257. "Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanacid in Penicillin Fermentations"
25. Claridge, C.A., Gourevitch, A. & Lein, J. (1960) Nature 187, 237.
"Bacterial Penicillin Amidase"
26. Rolinson, G.N., Batchelor, F.R., Butterworth, D., Cameron-Wood, J., Cole, M., Eustace, G.C., Hart, M.V., Richards, M. & Chain, E.B. (1960) Nature 187, 236. "Formation of 6-Aminopenicillanic Acid from Penicillin by Enzymatic Hydrolysis"
27. Kaufmann, W. & Bauer, K. (1960) Naturwissenschaften 47, 474.
"Enzymatische Spaltung und Resynthese von Penicillin"
28. Idsøe, O., Guthe, T., Willcox, R.R. & De Weck, A.L. (1969) Schweiz. med. Wochenschrift 99, 1190. "Art und Ausmaß der Penicillinnebenwirkungen"
29. Schneider, C.H. & De Weck, A.L. (1965) Nature, Lond. 208, 57.
"A new Chemical Aspect of Penicillin Allergy: the Direct Reaction of Penicillin with ϵ -Amino-Groups"
30. De Weck, A.L. & Eisen, H.N. (1960) J. Exp. Med. 112, 1227. "Some Immunochemical Properties of Penicillinic Acid, an Antigenic Determinant Derived from Penicillin"

31. Levine, B.B. & Ovary, Z. (1961) J. Exp. Med. 114, 875. "Studies on the Mechanism of the Formation of the penicillin Antigen. III. The N-(D - - Benzylpenicilloyl) Group as an Antigenic Determinant Responsible for Hypersensitivity to Penicillin G"
32. Parker, C.W. (1964) Postgrad. Med. J., Suppl. 40, 141.
- zitiert nach Idsøe, O. et al (28) -
33. Levine, B.B. & Price, V.H. (1964) Immunology 7, 542. "Studies on the Immunological Mechanism of Penicillin Allergy. II. Antigenic Specificities of Allergic Wheal- and Flare Skin Responses in Patients with Histories of Penicillin Allergy"
34. Protovinsky, R. (1967) Hippokrates 18, 742. "Kausale Therapie der Penicillin-Allergie mit Penicillinase"
35. Zimmermann, M.C. (1958) Clin. Med. V, 305. "The Prophylaxis and Treatment of Penicillin Reactions with Penicillinase"
36. Minno, A.M. & Davis, G.M. (1957) J. Amer. Med. Ass. 165, 222.
"Penicillinase in the Treatment of Penicillin Reactions"
37. Levine, B.B. (1963) J. Exp. Med. 117, 161. "Studies on the Dimension of the Rabbit Anti - Benzylpenicilloyl Antibody Combining Sites"
38. Becker, R.M. (1956) New Engl. J. Med. 254, 952. "Effect of Penicillinase on Circulating Penicillin"
39. Becker, R.M. (1958) Ann. Int. Med. 48, 1228. "A New Concept in the Treatment of Penicillin Reactions: Use of Penicillinase"
40. Feher, E. & Gozony, M. (1961) Allergie und Asthma 7, 42. "Erfahrungen mit der Penicillinasebehandlung der Penicillinallergie"

41. Idsøe, O., Guthe, T., Willcox, R.R. & De Weck, D.L. (1969)
Schweiz.med.Wschr. 99, 1252. "Art und
Ausmaß der Penicillinnebenwirkungen"
42. Scudi, J.V. & Woodruff, H.B. (1949) in "The Chemistry of Penicillins"
(Clarke, H.T., Johnson, I.R. & Sir R. Robin-
son, ed.) pp 1025-1042, Princeton University
Press, Princeton, N.J. "Assay of Penicillins"
43. Florey, H.W., Chain, E., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders,
A.G., Abraham, E.P. & Florey, M.E. (1949)
in "Anticlotics" 2.Chap. 33, Oxford Univers.
Press, London
44. Mc Quarrie, E.B. & Liebmann, A.J. (1944) Arch.Biochem. 5,307.
"Studies on Penicillinase"
45. Duthie, E.S. (1944) Brit.J.Exp.Path. 25, 96. "The Production of
Penicillinase by Organisms of the Bacillus
Subtilis Group"
46. Ungar, J. (1944) Nature 154, 236. "Penicillinase from Bacillus
Subtilis"
47. Woodruff, H.B. & Foster, J.W. (1944) J.Bacteriol. 47, 425.
"Bacterial Penicillinase"
48. Harper, G.J. (1943) Lancet II, 569. "Inhibition of Penicillin in
Routine Culture Media"
49. Brodersen, R. (1947) Acta Path.Microbiol.Scand. 24, 383 zitiert
nach "Antibiotics 2" (Florey, H.W., Chain,
E., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders,
A.G., Abraham, E.P. & Florey, M.E., ed.)
Oxford Univers.Press, London 1949
50. Rammelkamp, C.H. (1942) Proc.Soc.Exp.Biol. 51, 95. "A Method for
Determining the Concentration of Penicillin
in Body Fluids and Exsudates"
51. Ambler, R.P. & Meadway, R.J. (1969) Nature 222, 24. "Chemical
Structure of Bacterial Penicillinase"

52. Henry, R.J. & Housewright, R.D. (1947) J. Biol. Chem. 167, 559.
"II. Manometric Method of Assaying Penicillinase and Penicillin, Kinetics of the Penicillin - Penicillinase Reaction, and the Effects of Inhibitors on Penicillinase"
53. Murtaugh, J.J. & Levy, G.B. (1945) J. Amer. Chem. Soc. 67, 1042.
"Chemical Method for the Determination of Penicillin"
54. Wise, W.S. & Twigg, G.H. (1950) Analyst 75, 106.
"The Determination of Penicillinase Activity"
55. Sabath, L.D., Jago, M. & Abraham, E.P. (1965) Biochem. J. 96, 739. "Cephalosporinase and Penicillinase Activities of a β -Lactamase from *Pseudomonas Pyocyanea*"
56. Perret, C.J. (1954) Nature 174, 1012. "Jodometric Assay of Penicillinase"
57. Citri, N. (1958) Biochim. Biophys. Acta 27, 277. "Two Antigenically Different States of Active Penicillinase"
58. Hamilton-Miller, M.T. (1963) Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 43.
"Inducible Penicillinase in *Proteus Morgani*"
59. Novick, R.P. (1962) Biochem. J. 83, 236. "Micro-Jodometric Assay for Penicillinase"
60. Rossmann, I., Siegmund, P. & Körber, F. (1970) Z. Anal. Chem. 252, 199. "Spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Penicillinase"
61. Siegmund, P. & Körber, F. (1968) Clin. Chem. 14, 808. "The Determination of Penicillin by a Spectrophotometric Titration with p - Mercuribenzoate after Cleavage with Penicillinase"
62. Rossmann, I. (1971) Dissertation "Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Penicillinase und ihre Anwendungen"

63. Lineweaver, H. & Burk, D. (1934) J. Amer. Chem. Soc. 56, 658.
"Determination of Enzyme Dissociation
Constants"
64. Wombacher, H. (1974) Persönliche Mitteilung
65. Biagi, G. L., Barbaro, A. M., Gamba, M. F. & Guerra, M. C. (1969)
J. Chromatog. 41, 371. "Partition Data of
Penicillins Determined by Means of Reversed-
Phase Thin Layer Chromatography"
66. Tompson, H. W., Brattain, R. R., Randall, H. M. & Rasmussen, R. S.
(1949) in "Chemistry of Penicillins" (Clarke,
H. T., Johnson, J. Z. & Sir R. Robinson, ed.)
chap. XIII, pp 382-414. Princeton Univ. Press,
Princeton "Infrared Spektoscopic Studies of
Penicillin"
67. Baxter, J. N., Cymerman-Craig, J. & Willis, J. B. (1955) J. Chem.
Soc. 669. "The Infrared Spectra of Some
Sulphonamides"
68. DAB VII (1968) Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart pp 764-768,
Golvi-Verlag GmbH, Frankfurt
69. Körber, F., Modersohn, D. & Siegmund, P. (1968) Z. Klin. Chem.
klin. Biochem. 4, 289. "Über die photometri-
sche Titration von Thiazolidinen mit p - Mer-
curibenzoat und die Anwendung zur enzyna-
tisch - photometrischen Penicillinbestimmung"
70. Woodward, R. B., Neuberger, A. & Trenner, N. R. (1949) in "Chemi-
stry of Penicillins" (Clarke, H. T., Johnson,
I. R. & Sir R. Robinson, ed.) Chap. XIV pp 415-
439. Princeton Univ. Press, Princeton, N. J.
"Other Physical Methods"
71. Citri, N. & Pollock, M. R. (1966) Advanc. Enzymol. 28, 237. "The
Biochemistry and Function of β -Lactamase
(Penicillinase)"

72. Pollock, M.R. (1968) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 151, 502. "The Range and Significance of Variations amongst Bacterial Penicillinases"
73. Imsande, J., Gillin, F.D., Tanis, R.J. & Atherly, A.G. (1970), *J.Biol.Chem.* 245, 2205. "Properties of Penicillinase from *Bacillus Cereus* 569"
74. Citri, N. (1971) in "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.) 3rd ed., Vol. IV, pp 23-46, Academic Press New York and London "Penicillinase and other β -Lactamases"
75. Citri, N. & Garber, N. (1958) *Biochim.Biophys.Acta* 30, 664.
"The Effect of Urea on the Activity of Penicillinase"
76. Citri, N. & Garber, N. (1960) *Biochim.Biophys.Acta* 38, 50.
"An Effect of the Substrate on Urea - Modified Penicillinase"
77. Citri, N. & Zyk, N. (1967) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 26, 216.
"Determination of a Constant for a specific Conformational Transition"
78. Banfield, J.E. (1957) *Experientia* XIII/10, 403. "Kinetics of Penicillinase Activity"
79. Michaelis, L. & Menton, M.L. (1913) *Biochem. Z.* 49, 333. "Die Kinetik der Invertinwirkung"
80. Fischer, E. (1894) *Chem.Ber.* 27, 2985. "Einfluß der Configuration auf die Wirkung der Enzyme"
81. Koshland, D.E., Jr. (1959) in "The Enzymes" (Boyer, P.D., Lardy, H. & Myrback, K., ed.) 2nd ed., 1, p 305. Acad.Press, New York
82. Citri, N. & Zyk, N. (1965) *Biochim.Biophys.Acta* 99, 427. "The Interaction of Penicillinase with Penicillins. IV. Structural Aspects of Catalytic and Non-Catalytic Interactions"

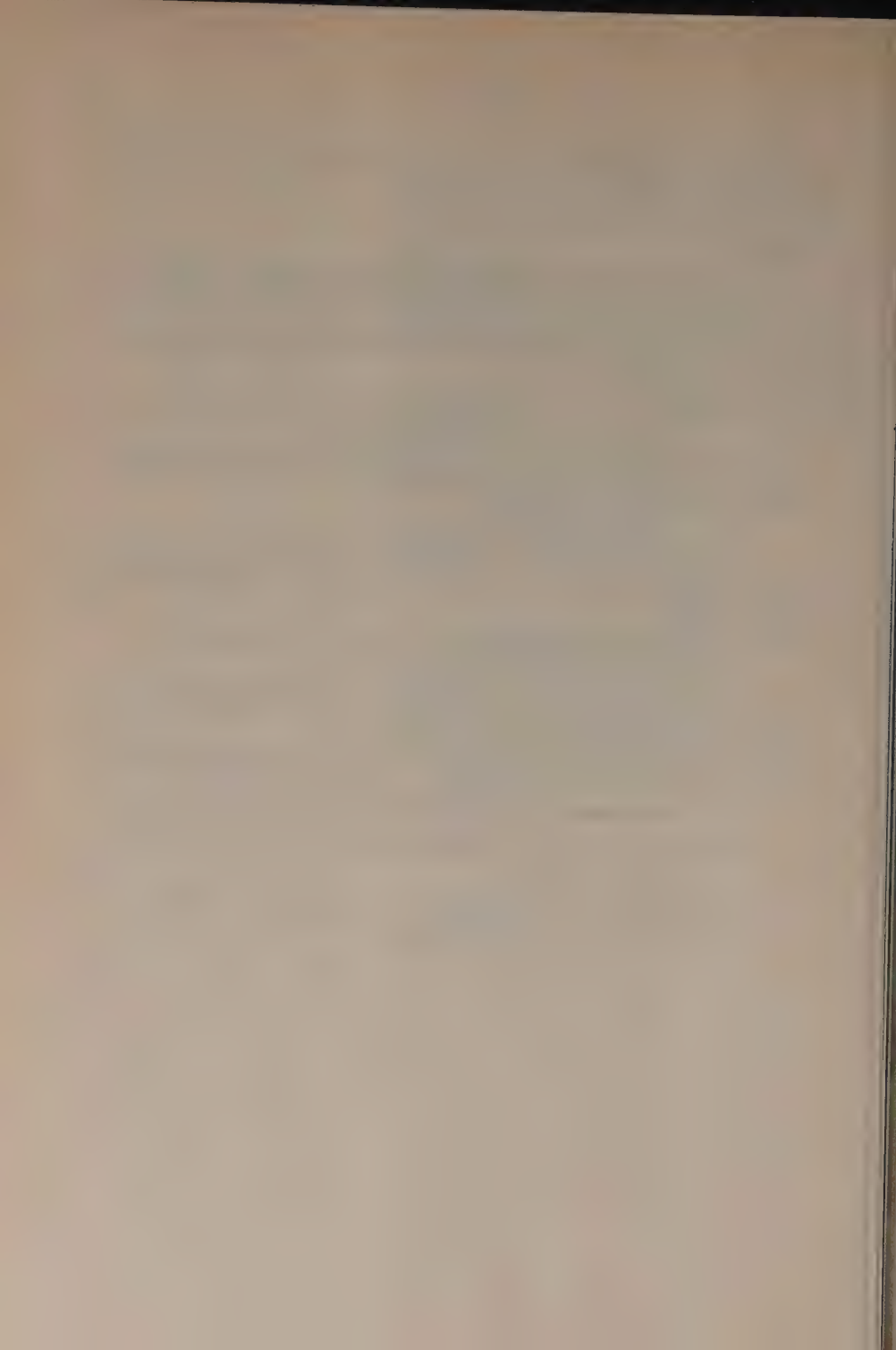
83. Depue, R.H., Moat, A.G. & Bondi, A. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 107, 374. "The Relation between Penicillin Structure and Penicillinase Activity"
84. Csányi, V., Mile, I., Koczka, I., Badár, E. & Horváth, I. (1970) Biochim. Biophys. Acta 220, 317. "A Particular Conformational Change of *Bacillus Cereus* Penicillinase Under the Action of a New Penicillin Analogue Pyrazocillin"
85. Citri, N. & Kalkstein, A. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121, 720. "Purification and Properties of the α - Type β -Lactamase of *Bacillus Cereus*"
86. Zyk, N. & Citri, N. (1968) Biochim. Biophys. Acta 151, 306. "Anomalous Dissoziation Constants for Penicillinase and Competing Substrates"
87. Garber, N. & Citri, N. (1962) Biochim. Biophys. Acta 62, 385. "The Interaction of Penicillinase with Penicillins. I. Effect of Substrates and of a Competitive Inhibitor on Native and Urea Treated Enzyme"
88. Dixon, M. (1953) Biochem. J. 55, 170. "The Determination of Enzyme Inhibitor Constants"
89. Koshland, D.E., Jr., Némethy, G. & Filmer, D. (1966) Biochemistry 5, 365. "Comparison of experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits"
90. Hill (1910) J. Physiol. 40, IV "The Possible Effects of the Aggregation of the Molecules of Haemoglobin on its Dissociation Curves"
91. Citri, N. (1962) J. Pharm. Pharmacol. 14, 784. "The Nature of Resistance of a Penicillin to Hydrolysis by Penicillin"

92. Weber, G. (1952) *Biochem. J.* 51, 155. "Polarization of the Fluorescence of Macromolecules. 2. Fluorescent conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumine"
93. Seiler, N. (1970) in "Methods of Biochemical Analysis" (Glick, D., ed.) Vol. 18, pp 259-337, Interscience Publishers, John Wiley and Sons, New York, Sydney, Toronto "Use of Dansylreaction in Biochemical Analysis"
94. Gray, W.R. (1967) in "Methods in Enzymology" (Hirs, C.H.W., ed.) Vol. XI, pp 139-151, New York and London "Dansyl Chloride Procedure"
95. Levy, G.B. (1950) *Nature* 166, 740. "A Unit of Penicillinase"
96. Boyer, P.D. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 4331. "Spectrophotometric Study of the Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials"
97. Rauen, H.M. (Hrsg.) (1964) *Biochemisches Taschenbuch* Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg
98. Robinson, R.A. & Stokes, R.A. (1959) in "Electrolyte Solutions" London, New York

G. Danksagungen

Ich danke

- Herrn Prof. Dr. F. Körber für die Betreuung der Arbeit
- Herrn Prof. Dr. P. Siegmund für die Anregungen, die von Frau Dr. I. Jend-Rossmann begonnenen Untersuchungen weiterzuführen
- Herrn Ass. Prof. Dr. H. Wombacher für die Beratung bei der kinetischen Interpretation der Ergebnisse
- Herrn Dipl. -chem. P. Dietsch und Herrn Dipl. -chem. S. Nickel für praktische Ratschläge
- Frau Ass. Prof. Dr. H. Langmaack für die Überlassung des Untersuchungsmaterials zur mikrobiologischen Resistenzbestimmung
- der Firma Kettelhack Riker - Herrn Dr. D. R. Kettelhack - für die Überlassung der Penicillinase Riker
- der Firma Beecham - Herrn Platz - für die Überlassung von Penicillinen und 6-Aminopenicillansäure
- der Firma Bayer Leverkusen - Frau Dr. B. Janitschke - für die Überlassung von Penicillinen und 6-Aminopenicillansäure
- der Firma Hoechst - Herrn Dr. Flamme - für die Überlassung von Penicillinen
- der Firma Wyeth International Ltd. - Herrn J. N. Bethish - für die Überlassung von Nafcillin



H. Lebenslauf

Am 1. Dezember 1946 wurde ich als Sohn des Dipl. -Ing. Wilhelm Münch und seiner Ehefrau Gudula Münch geb. Keese in Markt Schwaben geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Domschule in Minden/W. Nach weiteren 9 Jahren Schulzeit am Staatlichen Besselgymnasium in Minden bestand ich dort am 23. Februar 1966 das Abitur.

Nach zweijähriger Dienstzeit bei der Bundeswehr begann ich im April 1968 mit dem Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, wo ich am 5. August 1974 das Staatsexamen bestand.

Während der klinischen Semester war ich als studentische Hilfskraft am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik tätig. Seit dem 1. Oktober 1974 bin ich als Medizinalassistent an diesem Institut beschäftigt.

Am 2. December 1941 wurde ich als Soldat der Luftwaffe in die Wehrmacht übernommen. Ich wurde in die 1. Flieger-Division in Berlin eingeteilt.

Vom 1. Januar 1942 bis zum 31. März 1942 wurde ich in der 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt. Ich wurde in der 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt.

Ich wurde am 31. März 1942 in die 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt.

Am 1. April 1942 wurde ich in die 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt.

Am 1. April 1942 wurde ich in die 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt.

Am 1. April 1942 wurde ich in die 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt.

Am 1. April 1942 wurde ich in die 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt.

Am 1. April 1942 wurde ich in die 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt.

Am 1. April 1942 wurde ich in die 1. Flieger-Division in Berlin eingesetzt.

